Zur Chemie und Pharmakologie von Baccharis tricuneata (Lf.) Pers.

Renate Seitz

1979

Zur Chemie und Pharmakologie von

Baccharis tricuneata (Lf.) Pers.

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

des

Fachbereichs Chemie und Pharmazie

der

Ludwig-Maximilians-Universität

zu München

vorgelegt

von

Renate Seitz

aus

Fürstenfeldbruck

November 1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. W a g n e r

2. Berichterstatter: Professor Dr. F. E i d e n

Tag der mündlichen Prüfung: 5.2.1979

DISSERTATIONS– UND FOTODRUCK FRANK oHG
8 München 2, Gabelsbergerstraße 15, Tel. 2 8 0 9 0 9 0

Meinem Vater gewidmet
in Erinnerung

Herrn Professor Dr. H. Wagner danke ich sehr herzlich für das große Interesse an dieser Arbeit und ihre stete Förderung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. W. Herz für die Einladung und den damit ermöglichten Aufenthalt an seinem Institut, für wertvolle Anregungen und die vielseitige Unterstützung dieser Arbeit.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

EINLEITUNG 1

ALLGEMEINER TEIL 2

1.0 Allgemeine Übersicht 2

1.1 Vorkommen und botanische Beschreibung 2

1.2 Bisherige Kenntnisse über Baccharis-Arten . . 3

1.21 Volksmedizinische Verwendung 3

1.22 Bisherige Untersuchungen von B.-Arten . 4

2.0 Untersuchungen von Inhaltsstoffen von B.tricuneata 8

2.1 Vorproben und Isolierungen 8

2.11 Orientierende chromatographische Prüfungen 8

2.12 Alkaloid-Screening 9

2.13 Isolierung von Substanzen A und B . . . 11

2.14 Chemische Charakterisierung von A und B 12

2.15 Chemisches Screening auf Ehrlich positive Substanzen 13

2.16 Isolierung der Substanzen C und D . . . 15

2.17 Isolierung von Flavonen und Cumarinen . 17

3.0 Strukturaufklärungen 20

3.1 Strukturaufklärung von Bacchotricuneatin A . . 20

3.11 Nachweis eines β-substituierten Furanrings 20

3.12 Diskussion der Spektren 22

3.13 Ableitung der Struktur 26

3.2 Strukturaufklärung von Substanz B 35

3.21 Diskussion der Spektren 35

3.22 Ableitung der Struktur 37

3.3 ^{13}C-NMR-Spektroskopie von A und B 42

3.4 Röntgenstrukturanalyse von A und B 45

3.5 Strukturaufklärung von Substanz C 49

3.51 Diskussion der Spektren 49

3.52 Ableitung der Struktur 51

Seite

3.6 Strukturaufklärung von Substanz D 54
3.61 Diskussion der Spektren 54
3.62 Ableitung der Struktur D 57
3.63 Derivate von D 58
3.64 ^{13}C-NMR-Spektroskopie von D 61

3.7 Zur Stereochemie der Clerodanditerpene A mit D 63
3.71 Allgemeine biogenetische Voraussetzungen 63
3.72 Bestimmung der absoluten Konfiguration 65

3.8 Strukturaufklärung und Identifizierung der phenolischen Verbindungen 69

4.0 Pharmakologische Untersuchungen 71
4.1 Screening auf Antitumor-Wirksamkeit von Baccharis-Extrakten 71
4.2 In-vitro-Prüfung von Extraktfraktionen auf Hemmung der ^{3}H-Thymidin-Einbauraten in Ascites-zellen 74
4.3 In-vitro-Untersuchung im Zellkulturversuch auf Virus-hemmende Wirkung 75
4.4 Diskussion 77

5.0 Zusammenfassung 80

EXPERIMENTELLER TEIL 82
6.0 Herkunft der Droge 82

7.0 Allgemeine Arbeitsmethoden 82
7.1 Dünnschichtchromatographie 82
7.11 Adsorbens 82
7.12 Laufmittelsysteme 82
7.13 Detektionsmittel 83
7.2 Präparative Dünnschichtchromatographie . . . 85
7.21 Adsorbens 85
7.22 Bearbeitungstechnik 85
7.23 Laufmittelsysteme 85
7.3 Säulenchromatographie 85
7.31 Sorptionsmittel 86

Seite

8.0 Physikalisch-chemische Untersuchungen 86

9.0 Spezielle Arbeitsmethoden 89
9.1 Orientierende Voruntersuchungen 89
9.11 allgemein chromatographisch 89
9.12 Hydrolyse des flavonhaltigen Methanolextraktes 89
9.13 Untersuchung auf Saponine 89
9.14 Alkaloidscreening 90

10.0 Isolierungen 91
10.1 Bacchotricuneatin A und B aus alkalisierter Droge 91
10.2 Bacchotricuneatin A, B, C und D aus unbehandelter Droge 92
10.3 Isolierung der Flavone F_1 und F_2 95
10.4 Isolierung des Cumarins S_i 96

11.0 Strukturaufklärungen 97
11.1 Bacchotricuneatin A (1) 97
11.11 Lactontitration 98
11.12 katalytische Hydrierung von A 99
11.13 Röntgenstrukturanalyse von A 100
11.2 Bacchotricuneatin B (2) 102
11.21 Röntgenstrukturanalyse von B 104
11.3 Bacchotricuneatin C (3) 106
11.4 Bacchotricuneatin D (4a) 107
11.41 Selektive Monoacetylierung von D zu 4b 108
11.42 Jones Oxidation von 4b zum Monoacetatketon 109
11.43 MnO_2-Oxidation von D zum Aldehydalkohol (4d) 110
11.5 Cirsiliol 111
11.6 Cirsimaritin 112
11.7 Scopoletin 113

12.0 DC-Identifizierungen 113
12.1 Scopolin 113
12.2 Chlorogen- und Kaffeesäure 114

Seite

13.0 Pharmakologische Untersuchungen 115

13.1 Screening auf Antitumor-Wirksamkeit von Baccharis-Extrakten 115

13.2 In-vitro-Prüfung von Extraktfraktionen auf Hemmung der ^{3}H-Thymidin-Einbauraten in Ascites 115

13.3 In-vitro-Untersuchung im Zellkulturversuch auf Virus-hemmende Wirkung 117

LITERATURVERZEICHNIS 119

E I N L E I T U N G

Die in Südamerika weit verbreitete Pflanzengattung Baccharis ist in der Volksmedizin dieses Kontinents mit vielen arzneilich verwendeten Arten vertreten. Diese Drogen werden hauptsächlich bei bakteriellen und viralen Infekten sowie gelegentlich auch bei Krebserkrankungen verwendet. Obwohl bereits bei einigen Baccharis-Arten chemische Untersuchungen durchgeführt wurden, konnten bisher nur aus zwei Baccharis-Arten Verbindungen isoliert werden, die für diese Indikationsbereiche auch eine hinreichende pharmakologische Erklärung liefern.

Aus pharmakobotanischen Expeditionen stand für eine phytochemische Untersuchung Pflanzenmaterial von Baccharis tricuneata zur Verfügung. Diese Pflanze wird in Kolumbien in Form wässriger und alkoholischer Zubereitungen hauptsächlich als Febrifugum, Stomachikum und Antidiabetikum verwendet. Äußerlich dient sie als Antiseptikum und Desinfiziens, besonders bei virusbedingten Dermatosen. Außerdem wird über die erfolgreiche Anwendung der Droge bei sogenanntem "tumor canceroso" berichtet (2,11).

Hauptziel der folgenden Untersuchungen war die Identifizierung der wichtigsten Stoffklassen der Droge und die Strukturaufklärung ihrer Hauptverbindungen. Außerdem sollte mit Hilfe pharmakologischer Teste versucht werden, die volksmedizinische Anwendung wissenschaftlich zu belegen.

A L L G E M E I N E R T E I L

1.0 Allgemeine Übersicht

1.1 Vorkommen und botanische Beschreibung von Baccharis tricuneata (L.f.) PERS. var. tricuneata

Baccharis tricuneata (L.f.) PERSOON(Synonyme: B. microphylla H.B.K., B. mucuchiensis HIERON, Erigeron tricuneatum L.f. Suppl.) (1,2) ist ein kolumbianischer Vertreter der sehr artenreichen, nur auf dem amerikanischen Kontinent beheimateten Asteraceengattung Baccharis (Tribus Astereae) (3). Die meisten der etwa 400 bisher beschriebenen Spezies findet man in Südamerika in allen Klimabereichen. Einzelne dehnen sich bis in die USA aus, an der Atlantikküste etwa bis Massachusetts (4).

Neben Espeletia- stellen Baccharis-Arten ein wichtiges ökologisches Element der Paramos und Subparamos - riesige Ebenen in 2500 bis 4000 m Höhe - der sogenannten großkolumbianischen Anden dar, Kolumbien, Venezuela und Ecuador umfassend. Sie sind überaus polymorph. Von B. tricuneata kennt man allein 6 in Kolumbien endemische Varietäten (5).

Die von uns untersuchte Baccharis tricuneata var. tricuneata (siehe Abb. 1, S. 3) (in der Umgebung von Bogota gesammelt) wächst als etwa 1 m hoher, besenartiger Busch in 2500 bis 3200 m Höhe. Die holzigen, grünen Zweige sind dicht mit wechselständig halbsitzenden, blaßgrünen Blättchen von 6 - 10 mm Länge besetzt. Ihre dreigezackte Spatelform gab der Pflanze den Namen. Harze und ätherische Öle in den dunklen, tüpfelartigen Exkretbehältern der Blätter verleihen der Droge einen balsamischen Geruch, der Geschmack ist stark bitter.
Die kleinen, endständigen Pseudanthien (8 - 10 mm) enthalten bis zu 50 Röhrenblüten, die fast ganz von den schuppig angeordneten, dunkelgeränderten Hüllblättern eingeschlossen werden. Zur Reife bildet sich ein charakteristischer, weißer Pappus aus (4).

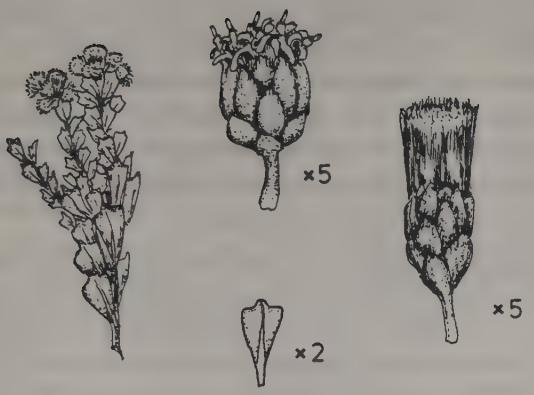


Abb. 1

Blütenzweig, Blatt und Blüte von Baccharis tricuneata (Lf.) PERS.

1.2 Bisherige Kenntnisse über Baccharis-Arten

1.21 Volksmedizinische Anwendungen

Viele Baccharis-Arten haben Eingang in die Volksmedizin Süd- und Mittelamerikas gefunden. Einige sind als offizinelle Arzneidrogen in den Pharmakopöen Brasiliens, Mexikos und Argentiniens aufgeführt: B.genistelloides PERS., B.glutinosa PERS., B.conferta H.B.K. und B.multiflora H.B.K..

Da alle Arten einen stark bitteren Geschmack aufweisen, werden sie hauptsächlich als Stomachika, Digestiva, Roborantia oder Cholagoga verwendet, vielfach auch als Antipyretika und Diuretika. Äußerlich appliziert dienen einige als Antiphlogistika und allgemein bezeichnete "Wundmittel", wie z.B. B.vulneraria D.C., B.trinervis PERS. und B.decussata HIERON..

Als Adstringentia oder zur Herstellung von Rheumapflastern werden B.genistelloides und B.latifolia verwendet (6,7). Zur Auflösung von Schwellungen und Tumoren und Förderung der Narbenbildung dient B.decussata in Kolumbien (2), ebenso wie die mexikanischen Arten B.glutinosa und B.notosergilla GRISEB.. Von diesen soll die letzte eine Heilwirkung bei Leberkrebs zeigen (8,9). Einzelne Baccharis-Arten dagegen sind als ausgesprochene Giftpflanzen bekannt, wie etwa die brasilianische B.cordofolia D.C. (9,10).

B.tricuneata var. tricuneata ist von den kolumbianischen Varietäten die gebräuchlichste Heilpflanze (1). Der Volksname "Sanalotodo" (= heilt alles) (weitere: Anisillo, Chilco) weist auf die vielfältigen Anwendungsbereiche hin.
Als Stomachika und in Verbindung mit geeigneter Diät als Antidiabetika werden wässrige Dekokte eingenommen, während alkoholische Tinkturen vor allem bei Erkältungskrankheiten als Febrifugum gelten. Das Kataplasma des rohen Saftes dient als Antiseptikum und Desinfiziens gegen Dermatosen (2). Über einen längeren Zeitraum angewendet scheint es besondere Wirkung bei Ulcus cruris, Herpes zoster und Hämorrhoiden zu zeigen, wie Befragungen von einheimischen Pflanzenkundigen im Raum Bogota ergaben. Danach wird der Drogenextrakt auch als Antiasthmatikum verwendet. In einem volkstümlichen Arzneibuch sind außerdem einige aufsehenerregende Heilungserfolge bei sogenannten "tumor canceroso" beschrieben (11).

1.22 Bisherige Untersuchungen von Baccharis-Arten

Auf Grund der vielfältigen Anwendung in der heimischen Medizin wurden bereits einige Baccharisarten auf ihre Inhaltsstoffe hin untersucht. Verbindungen verschiedenster Stoffgruppen wurden isoliert.

Für die allgemeine Tendenz der Asteraceen zur Bildung von Flavonoiden gibt es im Genus Baccharis zahlreiche Beispiele (12,13). Größtenteils handelt es sich um Quercetin- und Kämpferolabkömmlinge (14,15) und um Derivate des Apigenins und Luteolins (16,17,18). Bei der systematischen Suche nach

cytotoxisch aktiven Substanzen pflanzlichen Ursprungs isolierten KUPCHAN und Mitarb. aus B.sarothroides die beiden Flavonole 3,4'-Dimethoxy-3',5,7-trihydroxyflavon und Centaureidin. Beide zeigten eine deutliche Tumor-Hemmwirkung (19).

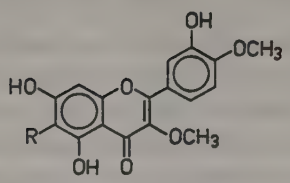
Kürzlich gelang im gleichen Arbeitskreis außerdem die Isolierung der antileukämisch wirksamen Bestandteile Baccharin, Baccharinol, Isobaccharin und Isobaccharinol aus B.megapotamica brasilianischer Herkunft. Es handelt sich hierbei um die ersten Epoxytrichotecene aus höheren Pflanzen. Die Extraktion der Substanzen wurde im pharmakologischen Test verfolgt, ihre Struktur mit Hilfe spektroskopischer Methoden und Röntgenstrukturanalyse geklärt (20,21).

Ausführlich untersucht sind die ätherischen Öle einiger Baccharisarten. Hauptbestandteile in den meisten Fällen sind α- und β-Pinen, Limonen, Nerolidol und Borneol, sowie Phenylpropanderivate (22,23,24). Aus dem Carquejaöl, in Brasilien offizineller Bestandteil von B.genistelloides, wurde unter anderem Carquejol und Carquejylacetat (d-o-Mentha-1,(7), 5,8-trien-ol) mit einer die Narkose steigernden Wirkung isoliert (25,26). Dem Carquejol verwandte Terpene gewann BOHLMANN aus den Wurzeln von B.timera (27).

In geringerer Konzentration wurden in den Ölen auch C-15-Körper, wie Ledol, γ- und δ-Cadinen oder Caryophyllen nachgewiesen (27,28). Auf Pinocembrin und das Sesquiterpen β-Eudesmol konnte die antimikrobielle Wirkung von B.glutinosa zurückgeführt werden (29).

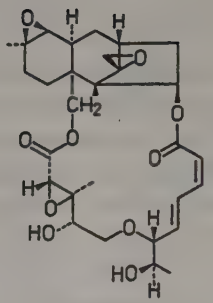
In der folgenden Übersicht sind einige der beschriebenen Verbindungen zusammengestellt:

Baccharis - Inhaltsstoffe

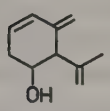


R = H 3,4'dimethoxy-3',5,7 trihydroxyflavon

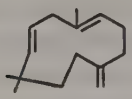
R = OCH_3 Centaureidin



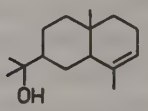
Baccharin



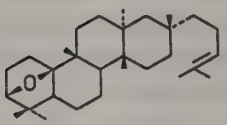
Carquejol



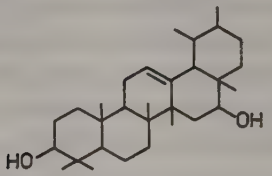
α-Caryophyllen



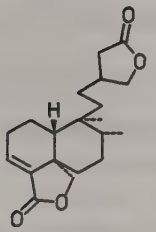
Eudesmol

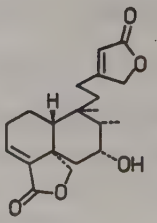


Baccharisoxid

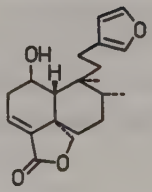


Brein

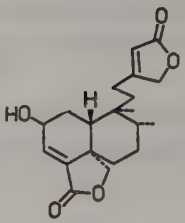




Diterpene aus B. trimera



Bacchofertin



Articulin

Abb. 2

Auffallend ist die strukturelle Ähnlichkeit der bisher bekannten Diterpene aus B.trimera (13), des Bacchofertin aus B.conferta (30) und Articulin bzw. Articulinacetat aus B.articulata (16). Sie leiten sich von dem bicyclischen Clerodan-Grundgerüst ab und unterscheiden sich hauptsächlich im Oxidationsgrad der Seitenkette.

Reichlich werden auch Triterpenoide gebildet. Es finden sich tetra- und pentacyclische Vertreter, wie z.B. Baccharisoxid, Stigmasterol und Friedooleanan-3β-ol bzw. Oleanolsäure und Brein oder Hentriacontanol, ein offenkettiger C_{30}-Körper (31,18). Zusammen mit diesen isolierte BOHLMANN und Mitarb. (28,32) aus weiteren Baccharis-Arten Cumarane, Polyacetylverbindungen und Matricariaester.

Eine Reihenuntersuchung südamerikanischer Asteraceen durch RICARDI und Mitarb. (34) ergab, daß einige Baccharis-Arten starke Hämolyse zeigen. Es ist jedoch die Isolierung nur eines Saponins mit noch ungesicherter Struktur aus B.genistelloides bekannt (33,35).

Schon 1879 bezeichnete ARATA und Mitarb. (6) Alkaloide als Ursache für die Giftigkeit von B.cordifolia, aber erst 1955 und 1966 wurde ihre Isolierung beschrieben (36,37). MONTES und Mitarb. (38) ordneten einige Substanzen, die sie für die hypotensive und antispasmodische Aktivität von B.linearis verantwortlich hielten, auf Grund einer positiven Dragendorff-Reaktion dieser Stoffklasse zu. Auch andere Autoren berichten von Alkaloiden aus Baccharis-Arten(39,18). Bei keiner der Verbindungen wurden aber nähere Angaben zur Struktur gemacht.
In einem umfassenden Alkaloid-Screening-Programm von SMOLENSKI und FARNSWORTH aus dem Jahre 1975 erwies sich nur eine der 17 bisher untersuchten Baccharis-Arten als alkaloidhaltig. Auch B.cordifolia zeigte negative Ergebnisse (40).

T a b e l l e 1

Bisher untersuchte Baccharis-Arten

Name	Isolierte Verbindungsklasse	Literatur
B.angustifolia	Flavone	15
articulata	Diterpene, Flavone	16
conferta	Cumarane, Diterpene, Polyine, Triterpene	28,30
cordifolia	Alkaloide, Fettsäuren, Wachse	36,37,10
dracunculifolia	Phenylpropane, Terpene	22
genistelloides	Sesquiterpene, Terpene	24,25
glutinosa	Sesquiterpene	29
linearis	Alkaloide	38
maritima	Alkaloide, Cumarine, Flavone, Phenole	39
megapotamica	Trichotecene	20,21
retusa	Flavone, Terpene	13
rhomboidales	Alkaloide, Flavone, Triterpene	18
rosmarinifolia	Flavone	12
var.subandina	Phenylpropane	23
salicifolia	Flavone, Triterpene	17,31
sarothroides	Flavone	19
timera	Terpene	27
trimera	Diterpene, Flavone	13
trinervis	Polyine	32
crispa	Flavone, Diterpen	156

2.0 Untersuchungen von Inhaltsstoffen von B.tricuneata

2.1 Vorproben und Isolierungen

2.11 Orientierende chromatographische Prüfungen

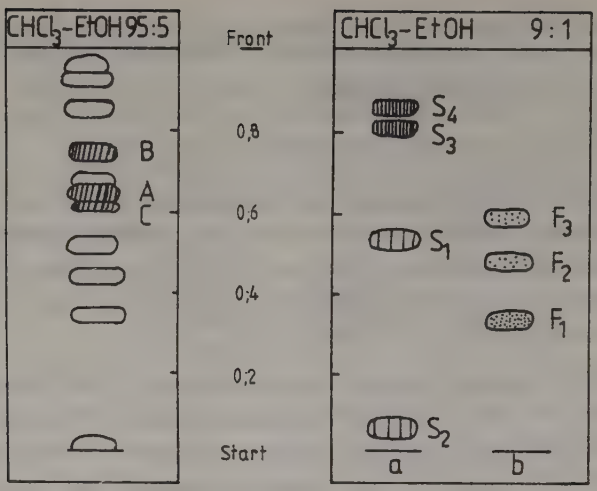
Um einen Überblick über die verschiedenen in der Droge vorliegenden Stoffklassen zu erhalten, wurden Benzol-, Äther- und Methanol-Extrakte der gepulverten oberirdischen Teile der Droge chromatographisch untersucht und mit verschiedenen Detektionsmitteln behandelt.

Es zeigte sich, daß der Benzolauszug (im LM: Benzol-Äthylacetat 1:1 und Chloroform-Äthanol 95:5) reich an terpenoiden und steroiden Verbindungen sein mußte. Wir erhielten positive Komarowsky, Liebermann-Burchard und Vanillin-Schwefelsäure-Reaktionen. Drei Verbindungen waren auch mit Dragendorff-Reagens (Alkaloide) und dem Hydroxylamin-Eisen-III-chlorid-Reagens (41) (Lactone, Carbonsäureester und -amide)anfärbbar (s.Abb.3, S.9).

Auffallend blau fluoreszierende Zonen, deren Farbe sich nach Ammoniakbedampfung intensivierte, deutete im Chromatogramm des Ätherextraktes (LM: Chloroform-Äthanol 9:1) auf das Vorliegen von Cumarinderivaten hin (42).

Durch das Bleiacetat- und Naturstoff-Reagens nach NEU (43) konnten im Äther- und Methanolextrakt freie und glycosidisch gebundene Flavonoide nachgewiesen werden. Das Salzsäure-Hydrolysat lieferte in den Systemen Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser 10:2:3 und Chloroform-Äthanol 9:1 eine orange- und zwei hellgelb fluoreszierende Aglukonzonen (vgl.Abb.3, S.9).

Trotz positiver Hämolysereaktion mit Blutgelatine, durchgeführt auf den Chromatogrammen der einzelnen Extrakte, konnten in Probeversuchen nach dem von TSCHESCHE (44) vorgeschlagenen Isolierungsschema und der Acetonfällung nach HILLER und KEIPERT (45) keine nennenswerten Mengen an Saponinen erhalten werden.



DC des Benzolextraktes

DC des Ätherextraktes

Detektion:

Komarowskys Reagens

Dragendorffs Reagens

a) Cumarinderivate
hellblaue Fluoreszenz bei 360 nm
dunkelblaue Fluoreszenz bei 360 nm

b) Flavonaglukonzonen
Detektion: Naturstoffreagens nach NEU
hellgelb bei 360 nm
orangegelb bei 360 nm

Abb. 3

DC der orientierenden Voruntersuchungen

2.12 Alkaloid-Screening

Zusätzlich untersuchten wir daraufhin die Droge nach einem von FARNSWORTH (46) entwickelten Alkaloid-Screening-Verfahren.

In parallelen Arbeitsgängen wurden aufeinanderfolgend Extraktionen mit Lösungsmitteln steigender Polarität durchgeführt (n-Hexan→ Äther→ Methanol), einmal mit unbehandelter Droge, einmal mit Droge, die vorher mit gesättigter Natriumcarbonatlösung durchgeknetet war. Die Alkalibehandlung sollte eventuell vorhandene Alkaloidsalze als Basen freisetzen.

Nach dem Abdampfen der Lösungsmittel nahmen wir die Rückstände in 1-2n Salzsäure auf und fällten aus der sauren Lösung die Alkaloide mit Mayers- oder Valsers-Reagens aus.

Die Entfernung störender Begleitstoffe und eine Anreicherung der Basen sollte durch Verteilung der organischen Phase gegen abwechselnd saure und alkalische wässrige Lösungen gelingen.

Die Extraktfraktionen, die aus der alkalisierten Droge erhalten wurden, zeigten die ausgeprägtesten Dragendorff-Reaktionen. Im DC des n-Hexanauszugs waren zwei starke und vier weniger intensive orangegelbe Flecken nachweisbar. Die Flecke im unteren R_f-Bereich waren auch noch im Ätherauszug erkennbar. Unbehandelte Droge lieferte im Chromatogramm der n-Hexanfraktion nur die drei Dragendorff-positiven Zonen des oberen R_f-Bereichs (s.Abb.4). Die Benennung der Hauptverbindungen A, B und C erfolgte in der Reihenfolge abnehmender Konzentration.

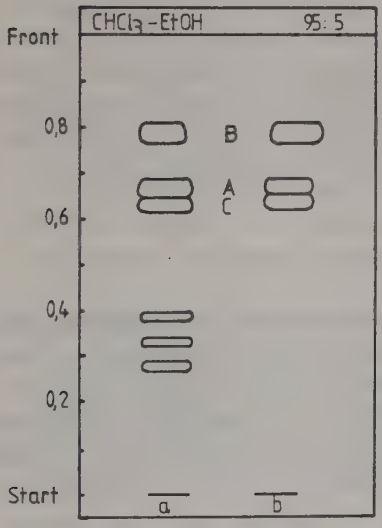


Abb. 4

DC zum Alkaloid-Screening

a) mit Na_2CO_3-Lsg. behandelte Droge

b) unbehandelte Droge

Detektion: Dragendorffs Reagens

Bei Zugabe von Mayers und Valsers Reagens zu den sauren Auszügen wurden zwar Niederschläge erhalten, doch sie waren durch Begleitstoffe gefärbt (46). Nach Reinigung und Anreicherung der entsprechenden Fraktionen im Verteilungsverfahren fielen Fällungs- und chromatographische Farbreaktionen anschließend nur noch äußerst schwach aus.

Ergebnis:

Neben einem verhältnismäßig hohen Gehalt an Cumarinen und Flavonen ließen sich beim DC-Screening des B.tricuneata-Extraktes Dragendorff-positive Verbindungen nachweisen. Ob es sich um Alkaloide handelte, war auf Grund der Farbreaktionen allein nicht zu entscheiden, da es nach FARNSWORTH (47) und ANDERSON (48) eine Reihe nichtstickstoffhaltiger Substanzklassen gibt, die ebenfalls eine Dragendorff-Reaktion geben. Zu diesen Verbindungen zählen α-Pyrone, Cumarine oder alkylierte Hydroxyflavone. Charakteristisch für sie ist eine konjugierte Carbonylfunktion als Strukturelement. Nach ANDERSON liefern auch eine Reihe von Steroiden und Triterpenen eine ähnliche Reaktion.

Wir versuchten zunächst diese Verbindungen A, B und C zu isolieren.

Parallel sollte neben der chemischen Untersuchung der Droge mit Hilfe pharmakologischer Testungen eine Überprüfung der volksmedizinischen Indikationsbereiche durchgeführt werden. Vorrangig erschien die Testung auf cytotoxische und virostatische Wirksamkeit.

2.13 Isolierung von Substanz A und B

Nach den Ergebnissen der Vorproben sollte die alkalisierte Droge die höchsten Ausbeuten ergeben. Das Drogenpulver wurde daher nach Entfettung mit Petroläther mit gesättigter Natriumcarbonatlösung angefeuchtet, das Material gut durchgeknetet, über Nacht getrocknet und anschließend mit n-Hexan erschöpfend am Soxhlet extrahiert (72 Stdn.). Nach mehrtägigem Stehen des Extraktes bei $0^{o}C$ schied sich ein heller

Niederschlag aus, der stark mit den beiden Dragendorff-positiven Hauptverbindungen A und B angereichert war.

Zur Weiterverarbeitung des Niederschlags wurden wiederholte Säulenchromatographien an Kieselgel mit Mischungen von Chloroform und Äthanol sowie n-Hexan und Äthylacetat durchgeführt. Beim Eindampfen der Fraktionen 29 - 103 erhielten wir die beiden Rohsubstanzen. Sie wurden weiter durch präparative Schichtchromatographie im System Chloroform-Äthanol 98:2 und durch mehrmaliges Umkristallisieren gereinigt.

Aus Dichlormethan/Äthanol kristallisierte Substanz A in grünlichen Prismen, Smp. 241 - 242°C.

B wurde aus Dichlormethan/n-Hexan in Form weißer Plättchen erhalten, Smp. 192 - 193°C.

Beide Verbindungen sind gut löslich in Chloroform, Dichlormethan und Benzol, praktisch aber unlöslich in n-Hexan, Äther und Äthanol, Methanol. Sie lassen sich im DC durch Löschung bei 254 nm nachweisen. Beim Besprühen mit verschiedenen Detektionsmitteln zeigen sie stets die gleichen Farbreaktionen: mit Vanillin-Schwefelsäure und Komarowskys Reagens schwarzblau, bläulich mit Hydroxylamin-Eisen-III-chlorid-Reagens und die besprochene Dragendorff-Reaktion.

Gegen Licht, Säuren und Laugen erwiesen sich beide Substanzen als labil. Im sauren Milieu und unter Lichteinstrahlung trat Gelbfärbung und Verharzung ein. Im Alkalischen kam es zu Abbaureaktionen, wobei laut DC definierte Produkte erhalten wurden. Sie erwiesen sich mit den "Alkaloiden" des unteren R_f-Bereichs als identisch.

2.14 Chemische Charakterisierung von A und B

Die CH-Analysen bestätigten den Verdacht, daß es sich um stickstoffreie Verbindungen handelte. Auf Grund der gemeinsamen Molekulargewichte von 342 (MS) errechnete sich für A und B die gleiche Summenformel $C_{20}H_{22}O_5$.

Das Fehlen von OH-Banden und das Vorliegen ausgeprägter Carbonylabsorptionen in den IR-Spektren sowie der hohe Oxydationsgrad ließen Verbindungen von Ester- oder Lactonnatur erwarten. Esterspaltungen wurden jedoch bei Methanolyse- und Hydrolyseversuchen nicht beobachtet.

Bei der potentiometrischen Titration der Verbindung A (vgl.Abb. 15, S.33) nach halbstündiger alkalischer Hydrolyse unter Rückfluß wurden 1.1 Mol Alkali-Äquivale pro Mol Substanz verbraucht. Das isolierbare Neutralisationsprodukt ergab ein MG von 360 (342 + H_2O). Nach dem Ansäuern einer äthanolischen Lösung des reinen Neutralproduktes konnte chromatographisch neben dieser Verbindung auch wieder die Ausgangssubstanz nachgewiesen werden. Beides spricht für den Lactoncharakter von Substanz A.

Mit 20 C-Atomen schien die Zuordnung von Substanz A und B zur Klasse der Diterpene wahrscheinlich. Sowohl Diterpendilactone (13,16) als auch ein Furanditerpenlacton (30) sind in Baccharisarten bereits beschrieben worden (vgl. S.7 und Abb. 2, S.6).

2.15 Chemisches Screening auf Ehrlich positive Substanzen

Zur Identifizierung der Clerodanditerpenverbindungen aus B.articulata und B.conferta verwenden MENSSEN (16) und GUERREIRO (30) Keddes und Ehrlichs Reagens.

Keddes Reagens (49) gibt mit Butenolidring in der Seitenkette enthaltenden Verbindungen eine Färbung, analog den Cardenoliden. Ehrlichs Reagens (50) (p-Dimethylaminobenzaldehyd in salzsaurer Lösung) gilt als charakteristischer Nachweis für Furanderivate.

Substanz A und B ergaben beim Besprühen mit Ehrlichs Reagens rosa Färbungen, die nach längerem Stehen in Dunkelviolett übergingen. Die Probe nach Kedde verlief negativ.

Auch die lipophilen Extraktfraktionen erwiesen sich als sehr reich an Ehrlich positiven Verbindungen.

Im DC des n-Hexanauszugs waren im Laufmittel Chloroform/ Äthanol 95:5 zehn Flecke anfärbbar (s.Abb.5), wobei sehr unterschiedliche Farbreaktionen zu beobachten waren: von sofortigem Schwarzblau über Violett bis Rosa.

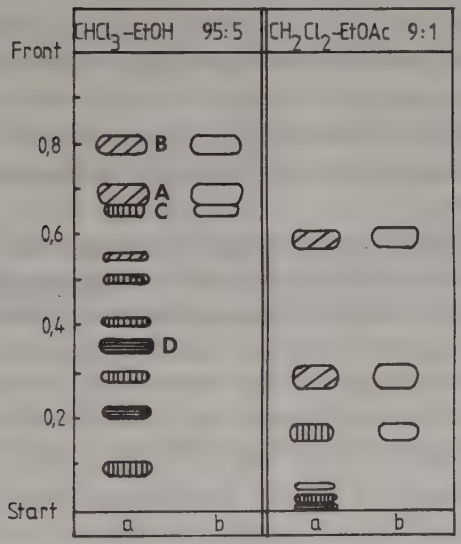


Abb. 5

Dünnschichtchromatogramm des Hexanextraktes

Anfärbung mit a) Ehrlichs Reagens

rosa

lila

schwarzviolett

b) Dragendorffs Reagens

2.16 Isolierung der Substanzen C und D

Die beobachtete Instabilität der Verbindungen A und B sprach für einen Isolierungsversuch aus unbehandelter Droge: Neben der Gewinnung weiterer Ehrlich positiver Substanzen sollte gleichzeitig bewiesen werden, daß A und B auch tatsächlich genuin in der Pflanze vorliegen. Sowohl der bekannte Bitterstoff Marrubiin(51) wie ein ebenso strukturverwandtes Diterpen aus Ballota nigra (52) hatten sich bei späteren Untersuchungen als Isolierungsartefakte erwiesen.

Neben höheren Ausbeuten von A und B konnten zwei weitere Verbindungen, C und D (vgl.Abb 5, S.14), kristallin erhalten werden.

Wir gingen von einem n-Hexanextrakt aus. Nach dem Abdestillieren des Lösungsmittels wurde der Gesamtextrakt über eine Kieselgelsäule mit dem Gemisch n-Hexan-Äthylacetat 4:6 vorgetrennt. Als Detektionsmittel diente Ehrlichs Reagens. Die Fraktionen mit den gesuchten Substanzen wurden über weitere Säulen und durch pärparative Dickschichtchromatographie mit geeigneten Elutionsmitteln weitergereinigt.

Nach den Erfahrungen der ersten Bearbeitung wurde Chloroform als Elutionsmittel weitgehend vermieden, da der Säureanteil des handelsüblichen Chloroforms in Verbindung mit Lichteinstrahlung die Polymerisation und Autoxidation(53) der gesuchten Substanzen stark förderte. Es mußte unter Lichtausschluß gearbeitet werden.

Die Substanzen A, B und C waren am besten im Laufmittel Dichlormethan-Äthylacetat 9:1, die stärker polare Verbindung D mit dem Gemisch Dichlormethan-Äthylacetat 1:1 abtrennbar.

Aus einer Dichlormethan-Äthanol-Mischung kristallisierte C in weißen Nadeln aus, Smp. 188 - 190°C. Es zeigt Lösungseigenschaften und Farbreaktionen wie die Substanzen A und B.

Verbindung D wurde durch Rekristallisation aus Äthylacetat-n-Hexan in Form weißer Drusen vom Smp. 109 - 111°C gewonnen. Sie löst sich gut in Äthylacetat und Dichlormethan, schwerer in Äthanol und Äther. Sie ist unlöslich in Benzol und n-Hexan. Im Gegensatz zu den drei anderen Verbindungen zeigt sie im DC keine Löschung bei 254 nm, keine Dragendorff-Reaktion und färbt sich mit Ehrlichs Reagens sofort schwarzlila an.

Mischschmelzpunkte der Substanzen A bzw. B aus dem ersten und zweiten Gewinnungsverfahren ergaben keine Depressionen. Eine chemische Umwandlung der Verbindungen im Lauf der ersten Isolierung war damit auszuschließen.

Schmelzpunkte und Ausbeuten der vier gewonnenen Reinsubstanzen, sowie ihre R_f-Werte in den verwendeten Laufmittelsystemen und ihr Detektionsverhalten sind nachstehend tabellarisch zusammengefaßt. Wir haben den Verbindungen die Namen Bacchotricuneatin A, B, C und D gegeben.

Tabelle 2

Substanz	Smp. in °C	Ausbeute in mg
A	241 - 242	270
B	192 - 193	160
C	188 - 190	4
D	109 - 111	105

Verb.	R_f-Werte in			Detektion mit		
	$CHCl_3$-EtOH (95:5)	CH_2Cl_2-ÄA (9:1)	n-Hexan-ÄA (4:6)	Löschung 254 nm	Ehrlichs R.	Dragend.R.
A	0.69	0.31	0.60	+	rosa	+
B	0.81	0.59	0.69	+	rosa	+
C	0.65	0.19	0.53	+	violett	+
D	0.37	0.00	0.21	-	schwarz-lila	-

2.17 Isolierung von Flavonen und Cumarinen

Zur Isolierung und Identifizierung der wichtigsten Cumarin- und Flavonanteile wurde der Drogenrückstand noch jeweils 48 Stdn. am Soxhlet mit Äther und anschließend mit Methanol extrahiert.

Nach mehrwöchiger Lagerung bei 0°C schied sich aus dem Ätherextrakt ein gelber mit Flavonen angereicherter Niederschlag aus. Seine Auftrennung an Kieselgelsäulen mit Lösungsmitteln steigender Polarität und mehrmaliger präparativer DC im System Chloroform-Methanol 9:1 erbrachte die Flavone F_1 und F_2. F_1 kristallisierte in gelben Nadeln aus Methanol, Smp. 273 - 275°C, F_2 aus Äthanol in hellgelben Prismen, Smp. 254 - 256°C.

Der überstehende Ätherextrakt wurde zur Gewinnung des Hauptcumarins S_1 eingeengt und gegen Chloroform-Wasser verteilt. S_1 reicherte sich quantitativ in der Chloroformphase an und konnte daraus nach weiterer Kieselgelsäulenchromatographie mit Benzol-Aceton 7:3 und mehrmaligem Umkristallisieren aus Chloroform in Form weißer Kristallnadeln rein erhalten werden, Smp. 205°C.

Substanz	Schmelzpunkt	Ausbeute
F_1	273 - 275°C	45 mg
F_2	254 - 256°C	18 mg
S_1	205°C	56 mg

Eine Charakterisierung der Verbindungen des Methanolextraktes wurde lediglich durch vergleichende Chromatographie mit Testsubstanzen in verschiedenen Laufmittelsystemen versucht.

I s o l i e r u n g s g a n g

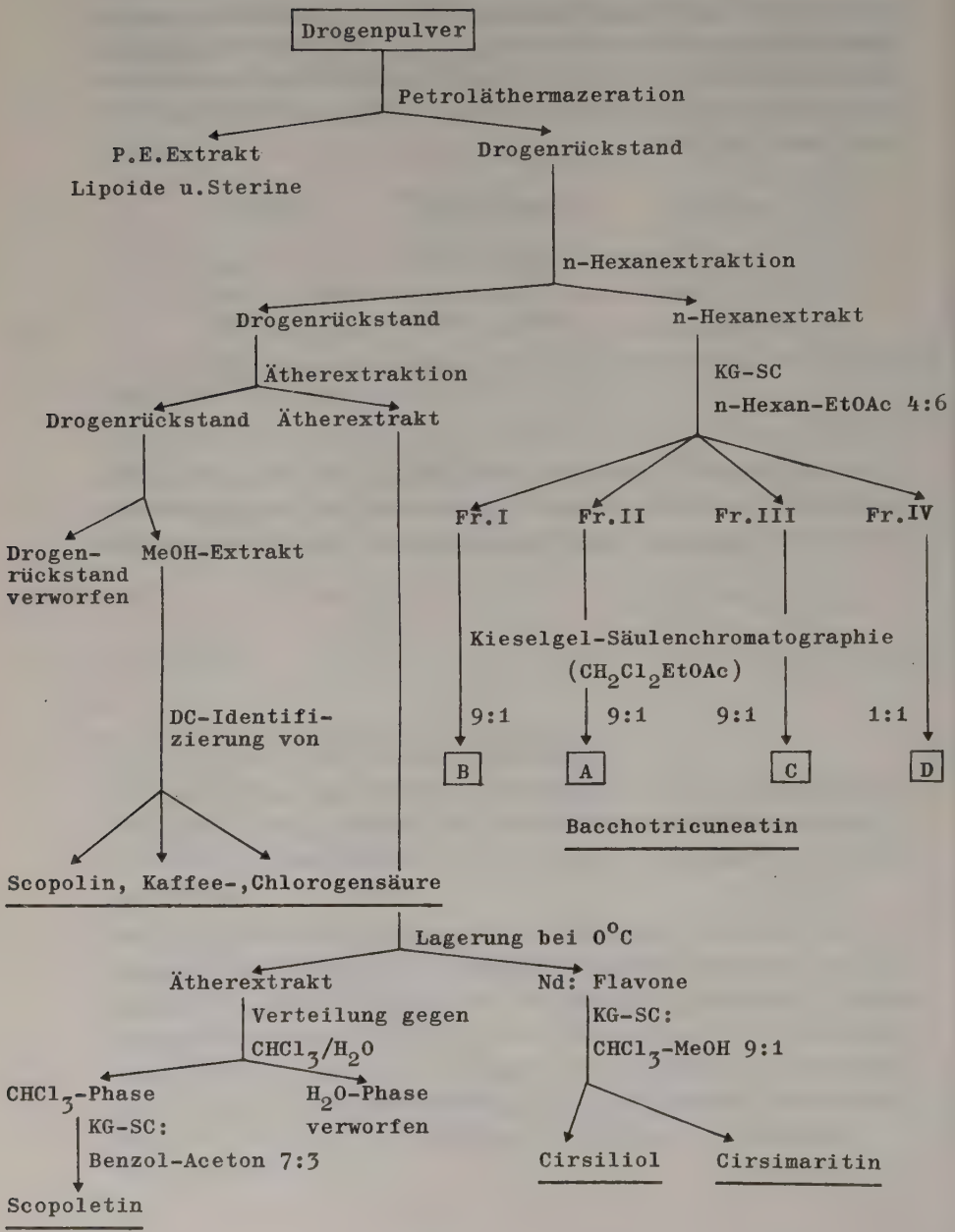


Abb. 6

3.0 Strukturaufklärungen

3.1 Strukturaufklärung von Bacchotricuneatin A

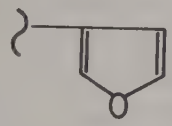
Elementaranalyse und Massenfeinbestimmung von Bacchotricuneatin A ergaben ein Molekulargewicht von 342,1468, woraus sich die Summenformel $C_{20}H_{22}O_5$ errechnet. Damit enthält die Verbindung laut Rechnung zehn Doppelbindungsäquivalente.

Die optische Drehung beträgt $[\alpha]_D^{25} = -121.3^\circ$, gemessen in Chloroform in einer Konzentration von 0.936.

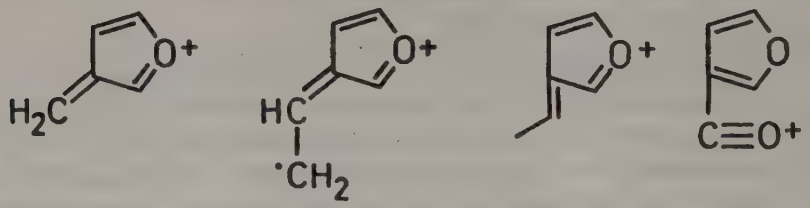
3.11 Nachweis eines β-substituierten Furanringes

Die Empfindlichkeit der Verbindung gegenüber Licht und Säuren, sowie die positive Ehrlich-Reaktion ließen das Vorhandensein eines Furanringes im Molekül vermuten (54). Die Auswertung der Spektren gab die Bestätigung. Kennzeichnend für einen Furanring sind im IR-Spektrum die Banden der -C-H-Valenzschwingungen bei 3150 cm^{-1} und die der >C=C< -Ringskelettschwingungen bei 1600, 1495 und 1440 cm^{-1}. Die Intensitäten der C-H-"out-of-plane"-Schwingungen bei 720, 770 und 870 cm^{-1} schwächen sich normalerweise mit Zunahme von Substituenten ab. Auf Grund ihrer relativ starken Ausbildung ist mit einem monosubstituierten Furanring zu rechnen (55).

Im ^{1}H-NMR-Spektrum erscheinen die beiden α-Furanprotonen als typische enge Multipletts bei tieferem Feld (δ = 7.43 und 7.48 ppm), während ein ebensolches 1 H-Multiplett bei 6.43 ppm einem β-Proton zugeordnet werden kann. Es muß sich demnach um einen β-monosubstituierten Furanring (Teilstruktur ⓐ) handeln.

ⓐ 

Das Massenspektrum liefert zusätzliche Beweise. Wie bei der Fragmentierung vieler furanoider Diterpene weist es Bruchstücke von hoher Intensität bei m/e 81, 94 und 95 auf, die durch Spaltungen in der Umgebung des Furanringes entstehen (56). Ihre Fragmentstrukturen, wie sie aus Abb. 7 zu ersehen sind, konnten durch die Hochauflösung bestätigt werden. Fragment m/e 95 kann in zwei Formen vorliegen.



m/e 81	m/e 94	m/e 95	m/e 95
C_5H_5O	C_6H_6O	C_6H_7O	$C_5H_3O_2$
(20%)	(90%)	(98%)	(21%)

Abb. 7

Fragmentierung der Furanseitenkette

3.12 Diskussion der Spektren

Neben den erwähnten Furanabsorptionen zeigt das IR-Spektrum (Abb. 8) von A zwei auffallende Carbonylabsorptionen an. Die erste bei 1750 cm^{-1} liegt im Bereich α,β-ungesättigter γ-Lactone. Die zweite Bande bei 1725 cm^{-1} kann von einem gesättigten Ester- oder δ-Lactoncarbonyl stammen (57). Bei 1645 cm^{-1} erscheint eine Doppelbindungsabsorption.

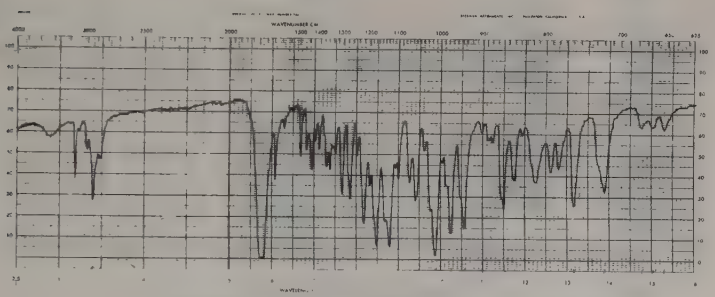


Abb. 8

IR-Spektrum von Bacchotricuneatin A

Da nach dem ^{13}C-NMR-Spektrum (siehe S.42) nur drei Doppelbindungen vorhanden waren, sprachen die errechneten zehn Doppelbindungsäquivalente dafür, daß die Carbonylbande bei 1725 cm^{-1} einem δ-Lactonring zukommen muß. Die starken C-O-Valenzschwingungen zwischen 1300 bis 1015 cm^{-1} können vom Furanring und den Lactongruppen stammen. Ausgeprägte C-H-Valenzschwingungen um 2950 cm^{-1} und C-H-Deformationsschwingungen bei 1480 bis 1400 cm^{-1} sprechen für ein stark hydriertes System.

OH-Gruppen können ausgeschlossen werden.

Das UV-Spektrum (vgl.Abb. 9, S.23) ist charakterisiert durch starke Endabsorption mit Inflexionen bei 210 und 238 nm (ε = 12100 bzw. 2350). Demnach dürfte die Furanabsorption, die in Form von Maxima bei 205 bis 210 nm ($\varepsilon \sim 5000$) oder

Endabsorption erscheint (58), von einem zweiten Chromophor überlagert sein.

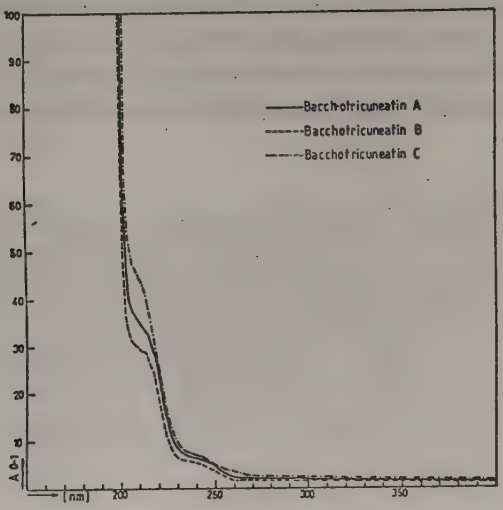


Abb. 9

UV-Spektren von Bacchotricuneatin A, B und C

In Frage kommt das aus dem IR-Spektrum ableitbare ungesättigte Lactonsystem, das im UV normalerweise eine Absorption bei 208 nm mit ε-Werten um 10000 liefert (59). (Vgl. dazu Bacchotricuneatin D und seine Derivate, Abb.32, S. 58).

Neben den Furanprotonen erscheint im ^{1}H-NMR-Spektrum (Abb.10) ein Doppeldublett bei 6.77 ppm (J = 7/3 Hz) im Bereich vinyler Wasserstoffe. Seine Lage bei niedrigem Feld ist charakteristisch für ein Proton, das sich in β-Position an einer zum Carbonyl konjugierten Doppelbindung befindet und durch den elektronegativen Sauerstoff entschirmt wird (60).

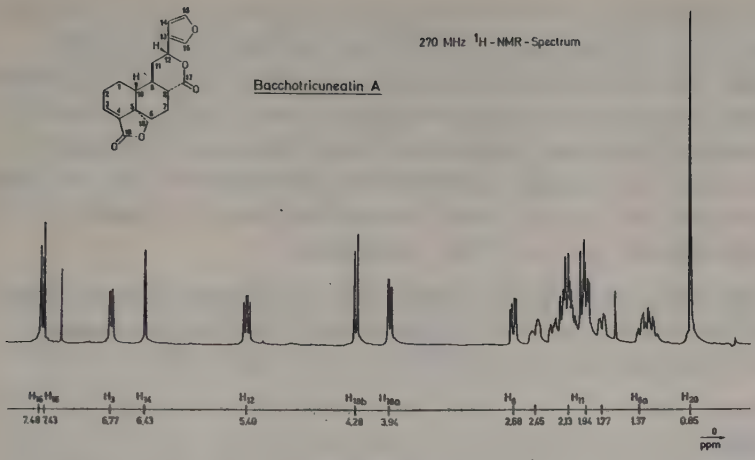
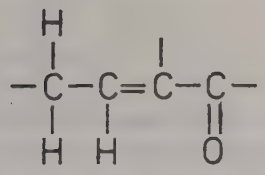


Abb. 10
270 MHz ^{1}H-NMR-Spektrum von Bacchotricuneatin A
(in $CDCl_3$)

Die Aufspaltung zum dd bewirkt die benachbarte Methylengruppe, deren Signale bei 2.27 und 2.45 ppm erscheinen. Weitere Protonen an der Doppelbindung fehlen. Daraus läßt sich Teilstruktur ⓑ ableiten.

ⓑ

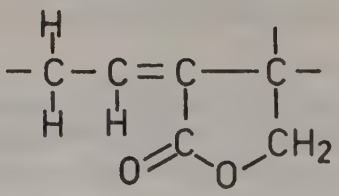


Das im NMR-Spektrum erkenntliche AB-System bei δ = 4.28 ppm (1H, d, J = 8 Hz) und δ = 3.94 ppm (1H, dd, J = 8/2 Hz) stammt von einer Methylengruppe, die auf Grund ihrer chemischen Verschiebung einem Sauerstoff und, wegen fehlender vicinaler Kopplung, einem quartären Kohlenstoff benachbart sein muß. Die geringe Aufspaltung des Dubletts bei δ = 3.94 ppm beruht auf einer "long range"-Kopplung zu einem Proton, dessen Signal bei 1.37 ppm erscheint.

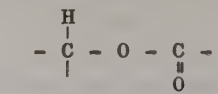
Ordnet man unter Berücksichtigung aller anderen spektroskopischen Daten diese Gruppierung dem γ-Lactonring zu, so kommt man zu einer erweiterten Teilstruktur ⓒ .

Mit ihr kann zugleich eine Erklärung für die positive Dragendorff-Reaktion der Verbindung gegeben werden. Voraussetzung soll bei N-freien Verbindungen nach FARNSWORTH (47) eine Gruppierung mit einem konjugierten Carbonyl sein (s.S.11).

ⓒ

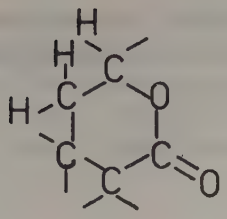


Da weitere Doppelbindungen im Molekül fehlen (siehe ^{13}C-NMR-Spektrum S.42), kann das 1H-Doppeldublett bei δ = 5.40 ppm (J = 8/11 Hz) einem Proton in der Gruppierung



zugeordnet werden. Seine Lage bei 5.40 ppm ist vergleichbar der chemischen Verschiebung von Methinprotonen an acetylierten sekundären OH-Gruppen. Das zweite Lactoncarbonyl im IR-Spektrum stützt diese Annahme. Auf Grund von Doppelresonanzexperimenten erweist sich das dd als der X-Teil eines ABX-Systems, dessen A- und B-Signale bei δ = 2.13 und 1.94 ppm liegen. Daraus leitet sich Teilstruktur ⓓ ab.

ⓓ



Letzter signifikanter Peak ist das Singulett einer angulären Methylgruppe bei 0.85 ppm.

3.13 Ableitung der Struktur

Hinweise über die mögliche Verknüpfung der ermittelten Teilstrukturen gaben Vergleiche mit anderen natürlich vorkommenden Diterpenen.

Alle bisher aus Baccharisarten isolierten Diterpene (13, 16,30) leiten sich von dem bicyclischen Clerodan-Grundgerüst ab.

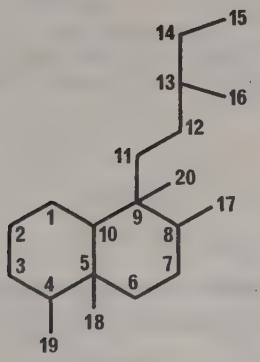
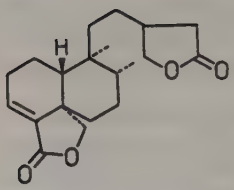


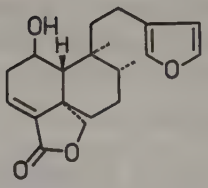
Abb. 11

Clerodangrundgerüst

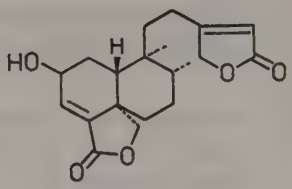
Alle lassen im Molekül die Teilstruktur ⓒ , eine häufige Oxidationsvariante in Clerodan-Diterpenen, erkennen (54, 61-66) (s.Abb. 12).



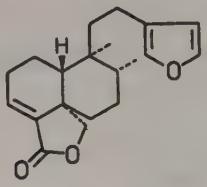
Diterpen (13)
aus B.trimera



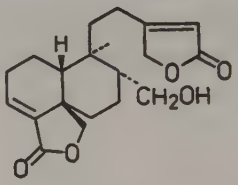
Bacchofertin (30)
aus B.conferta



Articulin (16)
aus B.articulata



Hautriwasäurelacton (61,62)
(Conyza ivaefolia, Dodonea
boroniaefolia)



Marrubialacton (64)
(Leonuris marrubiastrum)

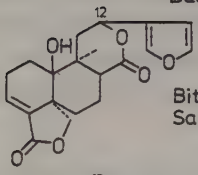
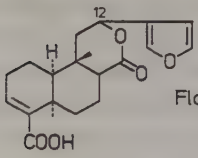
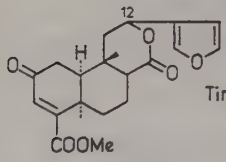
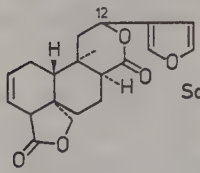
Abb. 12

Ausgewählte, verwandte Clerodan-Diterpene
(mit Teilstruktur ⓒ)

Das Signal bei 5.40 ppm weist in Aufspaltung und Lage große Ähnlichkeit mit den Resonanzen des C-12 Protons bei den Clerodan-Diterpenen aus Salvia rubescens (54), Evodia floribunda (Floribundasäure) (67), Tinomiscium philippinense (Tinophyllon) (68) und Salvia splendens (Salviarin) (69) auf.

T a b e l l e 3

Vergleich ausgewählter H-12 NMR-Resonanzen mit Bacchotricuneatin A

	H-12: δ,J(ppm,Hz)
Bacchotricuneatin A	5.40 dd 8/12
 Bitterstoff aus Salvia rubescens	5.65 dd
 Floribundasäure	5.27 dd 7/10
 Tinophyllon	5.38 dd
 Salviarin	5.36 dd 5/12

Wie von BARTON (70) zuerst bei dem Bitterstoff Columbin beobachtet, erhielten auch wir bei der katalytischen Hydrierung von Bacchotricuneatin A zwei Produkte:
ein Hexahydroderivat und eine Octohydrocarbonsäure (vgl.Abb.15, S. 33).

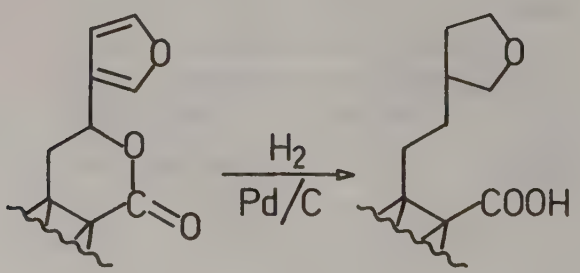
Das erste Produkt hatte ein MG von 348, IR-Banden bei 1770 (gesättigter γ-Lacton) und 1730 cm^{-1} (δ-Lacton), jedoch keine Furan- und Doppelbindungsbanden.

Die Säure ließ sich durch Ausschütteln mit Natriumcarbonatlösung von dem Hexahydroderivat abtrennen. Sie besaß ein MG von 350, das IR-Spektrum zeigte Banden bei 1765 (gesättigter γ-Lactonring) und 1700 cm^{-1} (Säurecarbonyl), ebenfalls keine Furan- und Doppelbindungsbanden.

Neben der Sättigung der Doppelbindungen hatte demnach auch eine Hydrogenolyse des δ-Lactonringes stattgefunden. Hydrogenolyse eines Lactonringes ist nur möglich, wenn der Alkylsauerstoff des Lactons in Vinyl- oder Allylstellung zu einer Doppelbindung steht (71,72).

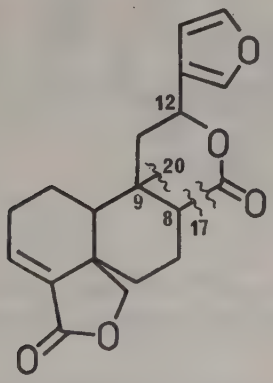
Von den drei Doppelbindungen im Molekül von Bacchotricuneatin A müssen zwei dem Furanring (Teilstruktur ⓐ , S.21), eine der Teilstruktur ⓒ zugeordnet werden. Da die Nachbargruppen der letzteren kernresonanzmagnetisch identifiziert sind (vgl.S.25), kann für den δ-Lactonring nur die Allylstellung zum Furanring in Frage kommen.

Diese Ergebnisse sprechen für folgende Teilstruktur von Bacchotricuneatin A:



Daß in Substanz A eine solche Lactongruppierung benachbart zum Furanring vorliegt, wurde zusätzlich durch das Intensitätenverhältnis der Massenbruchstücke m/e 95 (98% bzw. 20%), m/e 94 (90%) und 81 (20%) bestätigt (s.Abb.7, S.21). Massenspektroskopische Vergleiche verwandter Furan-Diterpene ergaben nach REED und REID (73), daß bei Verbindungen mit Allylstellung des Lactonsauerstoffs zum Furanring die Fragmente m/e 95 und m/e 94 überwiegen. Bei unsubstituierter Seitenkette dominiert dagegen das Fragment m/e 81.

Legt man auch der Substanz A das Clerodan-Gerüst, mit den beiden bewiesenen Strukturelementen ⓐ und ⓒ ergänzt, zugrunde, so kann biosynthetisch die Carbonylfunktion des zweiten Lactonrings nur durch Oxidation der C-20- oder C-17-Methylgruppe entstanden sein.



Die einzige in Substanz A nachweisbare Methylgruppe muß an einem quartären C-Atom stehen. Hierfür kommt nur die Position C-9 in Frage.

Somit muß das C-17 die Carbonylgruppe tragen und ein δ-Lactonring vorliegen. Gleichzeitig ist damit das Doppeldublett bei 2.68 ppm erklärt. Es muß dem Proton an C-8 zugeschrieben werden. Seine auffallende Verschiebung zu tiefem Feld wird durch die benachbarte Carbonylgruppe verursacht.

Die Protonen H-7a,b sind für die vicinale Kopplung von 5.5 und 14 Hz verantwortlich. Aus der Größenordnung dieser Aufspaltung wird eine axial/axial- bzw. trans- und eine äquatorial/axial- bzw. gauche-Kopplung erkennbar. Die C-8→C-17-Bindung steht daher äquatorial.

Nach diesen Ergebnissen kann für Substanz A folgende Planarstruktur abgeleitet werden:

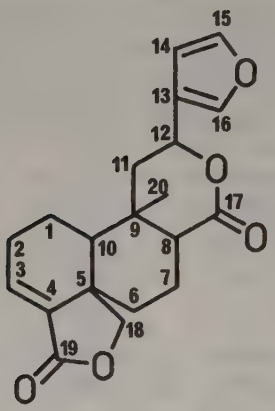


Abb. 13

Planarstruktur von Bacchotricuneatin A

Zahlreiche Doppelresonanzexperimente bei 270 MHz bestätigten das postulierte Clerodan-Grundgerüst. Durch die starke Auflösung des ^{1}H-NMR-Spektrums bei dieser hohen Feldstärke konnten alle vom Strukturvorschlag geforderten Protonen identifiziert werden. Ihre Zuordnung basiert auf der Korrelation beobachteter Veränderungen und Kopplungsberechnungen nach Einstrahlung jedes einzelnen Signals des Spektrums. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4, S.34, wiedergegeben.

Eine zusätzliche Bestätigung der Konstitution von Bacchotricuneatin A lieferten das protonenrauschentkoppelte ^{13}C-NMR-Spektrum und sein zugehöriges "off-resonance"-Spektrum (s.Abb. 14) sowie eine Einkristallröntgenstrukturanalyse. Beide werden zusammen mit den Ergebnissen bei Verbindung B auf S. 42 u. 45 diskutiert.

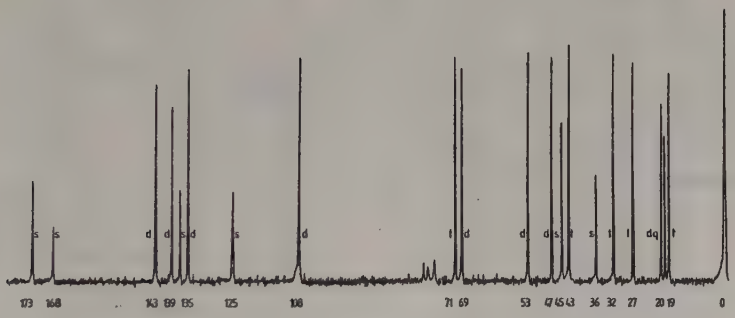


Abb. 14

^{13}C-Spektrum von Bacchotricuneatin A

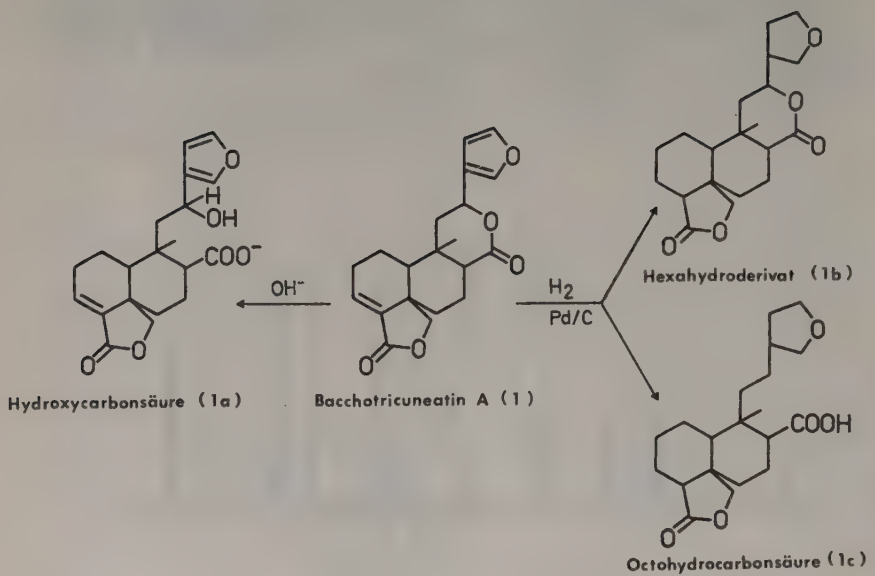


Abb. 15

Formulierung der chemischen Reaktionen von Bacchotricuneatin A

Tabelle 4 : ^{1}H-NMR-Spektraldaten von Bacchotricuneatin A, B, C, D und Derivaten
(in ppm, $CDCl_3$, 270 MHz)

Verb.	H-1	H-2	H-3	H-6	H-7	H-8	H-10	H-11	H-12	H-14	H-15	H-16	H-17	H-18	H-19	H-20	versch.
A (1)	1.25m 1.77m	2.45m 2.27m	6.77dd (7/3)	1.37m 2.17[g]	2.09[g] 1.91[h]	2.68dd (14/5.5)	1.94[h]	2.13[g] 1.94[h]	5.40dd (11/8)	6.43t (1)	7.48br	7.43t (1)		3.94dd (8/2) 4.28d (8)		0.85s[e]	
B (2)	1.21m 1.70m	2.35m 2.22m	6.67dd (7/2.5)	1.30m 2.07m	1.87m 1.66m	1.76[h]	1.80[h]	2.51[f] (8)	5.46t (8)	6.37br	7.46t (1)	7.44br	1.14d[e] (6)	4.01dd (9.5/2) 4.65d (9.5)			
C (3)	1.03m 1.85[i]	2.47m 2.26m	6.75dd (7/2.5)	1.38m 2.04m	2.11[h] 1.85[i]	1.51m	[j]	2.17[h]	4.95t (7)	6.37br	7.41br	7.37br	5.22br	3.88dd (8/2) 4.38d (8)		3.6d (9) 3.3dd (9/1.5)	
D (4a)		1.53 ($w_{1/2}$9) 2.22	5.51m	1.58 2.15	4.03m ($w_{1/2}$9)	1.67				6.24br	7.34br	7.18t (1)	1.04d[e] (7)	1.36s[e]	4.12br[f]	1.02s[e]	
(4b)			5.52br ($w_{1/2}$9)		4.04m ($w_{1/2}$9)					6.23br	7.34br	7.18br	1.05d[e] (7)	1.34s[e]	4.51br[f]	1.02s[e]	2.07s[e] (Ac)
(4c)			5.70m ($w_{1/2}$9)			2.66q (7)				6.26br	7.37br	7.22br	0.97d[e] (7)	1.06s[e]	4.49br[f]	0.75s[e]	2.05s[e] (Ac)
(4d)			6.55dd (5/4)		4.04m ($w_{1/2}$9)					6.24br	7.34br	7.31br	1.07d[e] (7)	1.44s[e]	9.3br	1.03s[e]	

Die Ziffern in Klammern sind Kopplungskonstanten in Hertz.
d = Dublett; t = Triplett; q = Quartett; br = verbreitertes Singulett;
m = Multiplett;
[e] = Intensität: 3 H; [f] = Intensität: 2 H; [g] = in 4-H-Multiplett;
[h] = in 3-H-Multiplett; [i] = in 2-H-Multiplett;
[j] = konnte nicht identifiziert werden.

3.2 Strukturaufklärung von Substanz B

Wie bereits erwähnt, zeigen die Verbindungen A und B auffallende Gemeinsamkeiten: positive Ehrlich- und Dragendorff-Reaktion, Säure- und Laugenempfindlichkeit, das gleiche Molekulargewicht von 342,1474 (hochauflösendes MS) und gleiche Summenformel $C_{20}H_{22}O_5$. Schmelzpunkt (191 - 192°C) und die optische Drehung ($[\alpha]_{20}^{D}$ = -93.3 in Chloroform, c = 0.932) waren jedoch deutlich verschieden.

3.21 Diskussion der Spektren

Das UV-Spektrum von B weist ebenfalls das von der Furanendabsorption überdeckte Maximum eines ungesättigten Lactonringes auf: λ_{max} = 210 (ε = 9843), 240 (ε = 1685) nm (s.Abb.9, S.23).

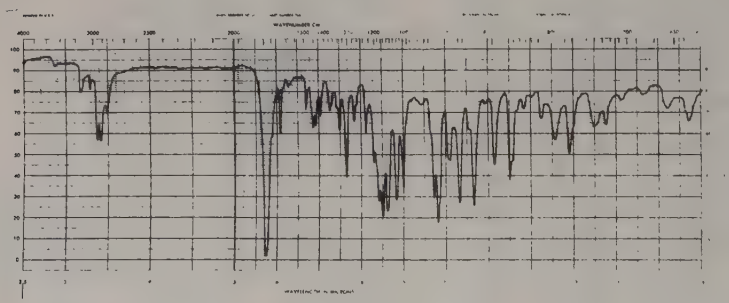


Abb. 16

IR-Spektrum von Bacchotricuneatin B

Übereinstimmend mit A läßt das IR-Spektrum (Abb. 16) von B neben der Abwesenheit von OH-Banden die Absorption des Furanringes bei 3160, 1490, 1430, 878 und 775 cm^{-1} und einer Doppelbindung bei 1640 cm^{-1} erkennen. Die einzige, scharfe Carbonylbande bei 1745 cm^{-1} ist auffallend intensiv und dürfte von zwei sich überlagernden Lactoncarbonyl-Banden herrühren. Der Lage nach stammt eine von einem α,β-ungesättigten Lacton.

Die Intensitäten der MS-Fragmente m/e 95 (C_6H_7O, 40%), 94 (C_6H_6O, 32%) und 81 (C_5H_5O, 14%) des hochauflösenden Massenspektrums lassen einen allylständigen Sauerstoff in der Furan-tragenden Seitenkette erwarten (73).

Bei erster Übersicht erscheinen die ^{1}H-NMR-Spektren von Substanz A (Abb.10, S.24) und B (Abb. 17) nahezu identisch. Enge Multipletts bei 7.46, 7.44 und 6.37 ppm bestätigen das Vorliegen eines β-substituierten Furanrings. Das Doppeldublett für das H-3 (δ = 6.67 ppm) an einer Doppelbindung koppelt mit 7 und 2.5 Hz, die Signale der vicinalen Methylengruppe resonieren bei 2.22 und 2.35 ppm. Auch das AB-System der Methylengruppe im α,β-ungesättigten γ-Lactonring (Teilstruktur ⓒ , s.S.25) ist wieder zu identifizieren, worauf schon die positive Dragendorff-Reaktion schließen ließ.

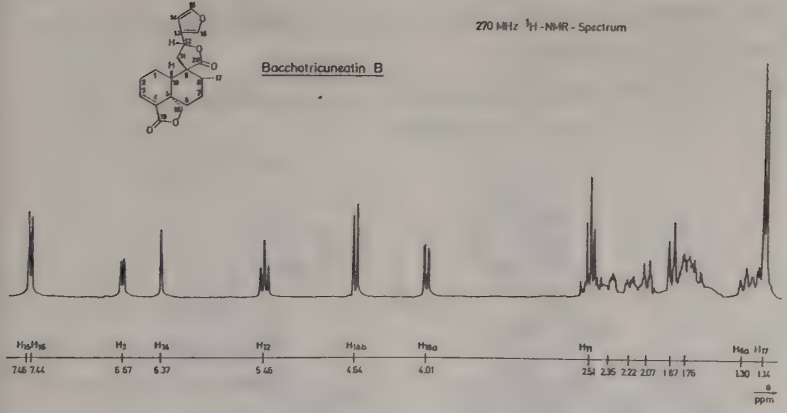


Abb. 17

270 MHz ^{1}H-NMR-Spektrum von Bacchotricuneatin B (in $CDCl_3$)

Das A-Signal bei 4.01 ppm ist wie bei Substanz A auf Grund einer W-Kopplung von 2 Hz nochmals gespalten. Das B-Signal ist jedoch im Vergleich zum Spektrum von A um dazu 0.4 ppm zu tieferem Feld verschoben (δ = 4.65 ppm, d, J = 9.5 Hz).

Eine Methylgruppe erscheint als Dublett bei 1.14 ppm mit einer 6 Hz-Kopplung, das für die Aufspaltung verantwortliche Proton bei 1.76 ppm. Somit ersetzt hier eine sekundäre Methylgruppe die tertiäre des Spektrums von A.

Im Bereich des H-12-Signals findet man an Stelle des Doppeldubletts ein Triplett (δ = 5.46 ppm, J = 8 Hz). Strahlt man bei der Frequenz des t ein, so kollabiert ein 2-Protonendublett bei 2.51 ppm.

3.22 Ableitung der Struktur

Diese Befunde lassen auch für Bacchotricuneatin B einen Furan-Clerodan-Grundkörper mit der als gesichert geltenden Teilstruktur © erwarten. Die sekundäre Methylgruppe kann in diesem Fall nur an C-8 gebunden sein.

Für die Oxidation zum zweiten Lactoncarbonyl kommt nur die Stellung C-20 in Frage.

Somit leitet sich für B nachstehende Struktur ab.

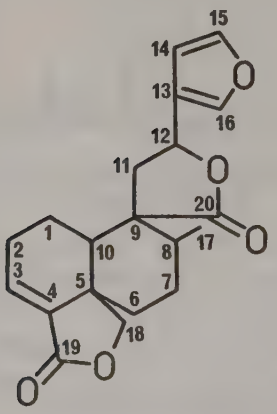


Abb. 18

Planarstruktur von Bacchotricuneatin B

Analog strukturierte γ-Lactonringe, die zum C-12 hin geschlossen sind und ein Spiro-C-Atom in Stellung 9 aufweisen, sind von den Diterpenen Pikropolin (72) und Corylifuran (74) und den Norditerpenen Teucvin (75) oder Montanin A (53) bereits bekannt. Ihre entsprechenden PMR-Daten sind mit denen der Verbindung B vergleichbar (siehe Tab.5).

T a b e l l e 5

Vergleich ausgewählter H-12 PMR-Resonanzen mit Bacchotricuneatin B

	H-12: δ, J (ppm, Hz)		
Bacchotricuneatin B	5.46	t	8
Pikropolin	5.45	t	8
Corylifuran	5.38	t	8
Teucvin	5.43	t	8.5
Montanin A	5.38	t	8

Das Triplett für H-12 (J = 8 Hz) im PMR-Spektrum von B anstelle eines Doppeldubletts, charakteristisch für Verbindungen mit einem δ-Lactonring, bekräftigt zudem das Vorliegen eines gesättigten γ-Lactonringes an dieser Position. In fünfgliedrigen Ringen tritt oft auf Grund der planaren Anordnung der Ringglieder und der erhöhten Ringspannung der Unterschied zwischen einer cis- und trans-Kopplung nicht in Erscheinung (76). Daß H-11a und b jedoch nicht isochron sind, wie es das Triplett vermuten läßt, sondern den AB-Teil eines ABX-Systems darstellen, wurde deutlich, als das Spektrum vergleichsweise in deuteriertem Pyridin oder Benzol anstelle von $CDCl_3$ aufgenommen wurde. Das Signal für H-11a,b konnte dann als 8-Linien-Multiplett mit Kopplungskonstanten von 8, 8.5 und 14 Hz identifiziert werden.

Auch für Verbindung B war es möglich, jedes Proton der Molekülstruktur im PMR-Spektrum durch Entkopplungsexperimente bei 270 MHz zuzuordnen (s.Tab.4, S.34). Zusätzlich konnte in diesem Fall der Kopplungspartner der "long range"-Kopplung von H-18a spektroskopisch ermittelt werden. Studien am Dreiding-Molekülmodell von A und B hatten bereits ergeben, daß nur das axiale Proton am C-6 die Voraussetzung zu einer W-Kopplung erfüllt, da es in einer Ebene mit H-18a liegt (77). In einer Folge von Doppelresonanzexperimenten konnte bewiesen werden, daß der "long range"-Partner zu H-18a in Nachbarschaft zu einer Methylengruppe steht, die mit einem weiteren vicinalen Proton gekoppelt ist. Dieses Proton war leicht als H-8 zu identifizieren, da sein Signal (δ = 1.76 ppm) bei der Einstrahlung des C-17-Methyldubletts kollabierte.

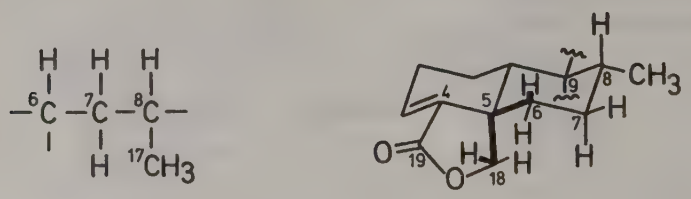


Abb. 19
W-Kopplung von H-18a zu H-6a

Da in den ^{1}H-NMR-Spektren von Bacchofertin (30) und den Clerodan-Derivaten aus B.trimera (13) dieselbe "long range"-Kopplung von 2 Hz zwischen H-18a und H-6a auftritt, war anzunehmen, daß in Bacchotricuneatin A und B analoge sterische Verhältnisse mit trans-Ringverknüpfung und darausfolgend trans-diaxialer Beziehung der Substituenten an C-5 und C-9 vorliegen. Die Röntgenstrukturanalyse bestätigte dies (s.S. 47).

Für Bacchotricuneatin A und B dürfen daher folgende Stereostrukturen angenommen werden:

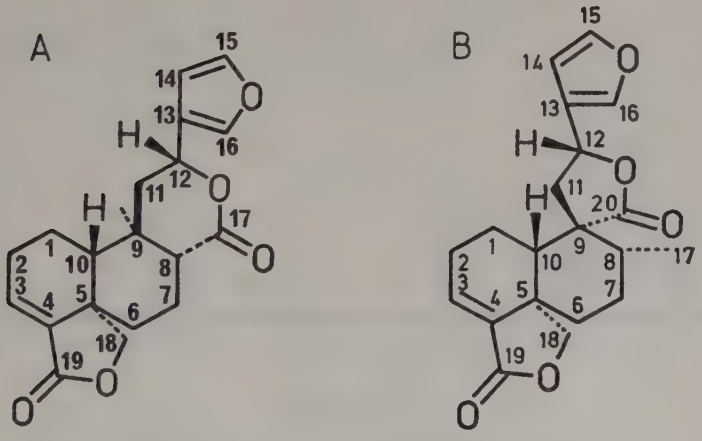


Abb. 20

Stereostrukturen von Bacchotricuneatin A und B

Aus den vorgeschlagenen räumlichen Strukturen erklärt sich der "downfield shift" von H-18a im ^{1}H-NMR-Spektrum von Bacchotricuneatin B. Auf Grund der axialen α-Stellung der C-9→C-20-Bindung ragt der gesättigte γ-Lactonring, wie das Molekülmodell der Röntgenstrukturanalyse zeigt (vgl. Abb.25, S. 48), senkrecht unter die Ebene des Decalingerüsts. Bedingt durch die magnetische Anisotropie dieser Carbonylgruppe gerät H-18b in ihren negativen Abschirmungsbereich und erscheint daher bei tieferem Feld.

3.3 ^{13}C-NMR-Spektroskopie von Substanz A und B

Die ^{13}C-NMR-Spektren von A (s.Abb.14, S. 32) und B (Abb.21) sind mit den angenommenen Konstitutionen gut vereinbar. Die Zuordnung der Signale (s.Tab.6, S.43 und Abb.22, S. 44) erfolgte mit Hilfe der Multiplizitäten im "off-resonance"-Spektrum, durch rechnerische Ermittlung unter Anwendung der üblichen shift-Parameter und durch Vergleiche mit Daten ähnlicher Clerodan- und Labdan-Diterpene (13,67,74,78,79,80). Auch hier deuten die augenscheinlichen Gemeinsamkeiten auf die nahe strukturelle Verwandtschaft der zwei Verbindungen hin.

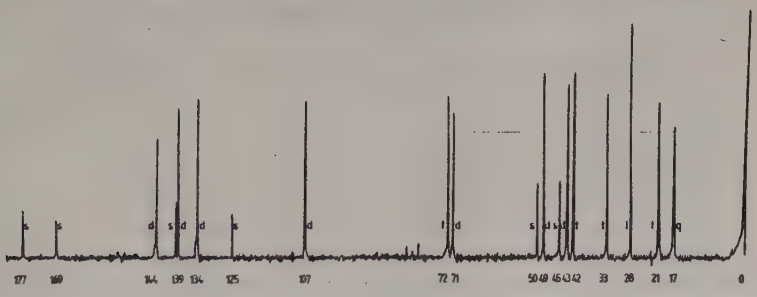


Abb. 21

^{13}C-Spektrum von Bacchotricuneatin B

Beide Spektren zeigen Resonanzen für einen β-substituierten Furanring (C-13 - C-16) (81). Zwei zusätzliche Signale im olefinisch-aromatischen Bereich sichern das Vorliegen nur einer weiteren Doppelbindung im Molekül (C-3 und C-4). Die schwachen Linien bei 173 und 168 ppm für A bzw. 177 und 169 ppm für B sind in Intensität und chemischer Verschiebung charakteristisch für Lactonkohlenstoffe. Da C-19 über die

konjugierte Doppelbindung zum Proton am C-3 koppelt und dadurch das Signal im "off-resonance" durch die Verbreiterung fast zum Verschwinden kommt, war eine eindeutige Zuordnung dieser beiden Signale möglich (C-17 bzw. C-20 und C-19) (82).

Gemeinsam ist beiden Verbindungen je eine am Sauerstoff gebundene CH- (d, C-12) und CH_2-Gruppe (t, C-18), deren Resonanzen bei ca. 70 ppm auftreten. Weiterhin lassen die "off-resonance"-Spektren erwartungsgemäß fünf Tripletts von Methylengruppen (C-1,2,6,7,11), zwei Dubletts der Methin- (C-8,10) und ein Quartett einer Methylgruppe (C-20 bzw. C-17) bei hohem Feld erkennen.

T a b e l l e 6

Kohlenstoff-13-Zuordnungen für Bacchotricuneatin A und B

	A	B
C-1	19.4 t	21.0 t
C-2	27.6 t	28.0 t
C-3	135.8 d	134.3 d
C-4	137.9 s	139.4 s
C-5	45.0 s	45.4 s
C-6	32.8 t	33.6 t
C-7	20.0 t	28.0 t
C-8	53.7 d	43.2 d
C-9	36.9 s	50.9 s
C-10	47.4 d	49.5 d
C-11	43.4 t	42.0 t
C-12	69.9 d	71.8 d
C-13	125.0 s	125.7 s
C-14	108.7 d	107.9 d
C-15	143.7 d	144.2 d
C-16	139.7 d	139.2 d
C-17	173.1 s	17.2 q
C-18	71.0 t	72.9 t
C-19	168.3 s	169.0 s
C-20	19.6 q	177.0 s

Die Unterschiede der Signale von C-8 und C-9 bzw. C-17 und C-20 in den Spektren von A und B entsprechen in der chemischen Verschiebung ganz den unterschiedlichen Strukturelementen der beiden Substanzen an diesen Punkten und stehen in völliger Übereinstimmung mit den jeweiligen Daten der verwandten Clerodan-Lactone Floribundasäure (67) und Corylifuran (74) (s.Tab.7). Die δ-Lactongruppierung an C-8 in A erklärt zudem auch den auffallenden upfield-shift von C-7 in dessen Spektrum. Nach WEIGERT und ROBERTS (83) erfahren Methylen-Kohlenstoffe in verdecktständiger ("eclipsed")Position zu einer Oxogruppe einen upfield-shift von 6 - 10 ppm.

T a b e l l e 7

Ausgewählte ^{13}C-NMR-Resonanzen von Bacchotricuneatin A, B, Floribundasäure und Corylifuran

	Floribundasäure (vgl.S.28)	Bacchotricuneatin A	Bacchotricuneatin B	Corylifuran (vgl.S. 38)
C-7	20.0	20.0 t	28.0 t	33.4 t
C-8	49.0	53.7 d	43.2 d	39.4 d
C-9	36.1	36.9 s	50.9 s	50.4 s
C-17	174.5	173.1 s	17.2 q	17.0 q
C-20	21.9	19.6 q	177.0 s	175.9 s

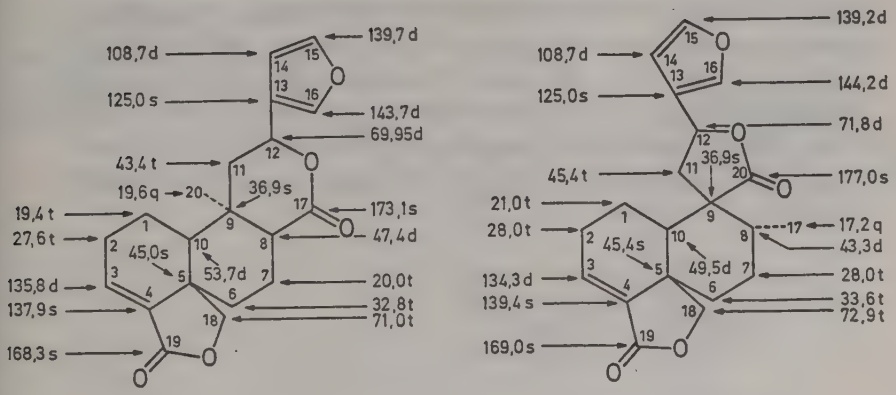


Abb. 22

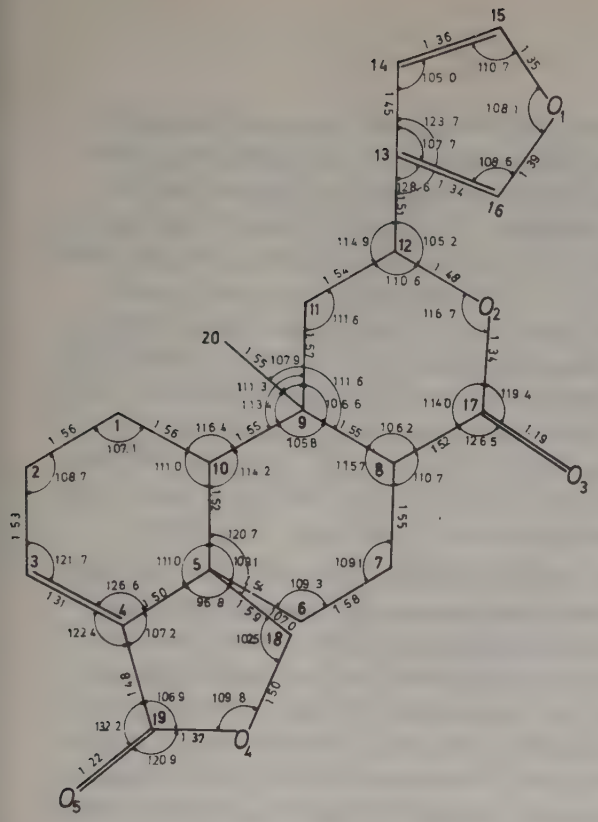
3.4 Röntgenstrukturanalyse von A und B

Die geeigneten Einkristalle für die Röntgenstrukturanalyse von der durchschnittlichen Größe 1 x 0.5 x 0.2 mm erhielt man für A aus Dichlormethan/abs.Äthanol (1:4), für B aus Dichlormethan/n-Hexan (1:5). Mittels photographischer Aufnahmen auf der Precession- und Weißenberg-Kamera konnten die Elementarzellenabmessungen bestimmt werden.

Die Kristalle beider Substanzen erwiesen sich als orthorhombisch mit Raumgruppe P $2_1 2_1 2_1$ und hatten folgende Zellkonstanten:

A	B
$a = 12.45_4$ Å	$b = 21.59_5$ Å
$b = 11.04_3$ Å	$b = 6.59_4$ Å
$c = 12.34_5$ Å	$c = 12.01_1$ Å
$\rho = 1.345$ g/cm^3	$\rho = 1.359$ g/cm^3

Die Dichte ρ wurde nach der Schwebemethode in einer wässrigen Lösung von Kaliumbromid und Kaliumjodid bestimmt. Für beide Kristallisate ergibt sich daraus das Vorliegen von vier Molekülen in einer Elementarzelle. Auf einem automatischen Einkristalldiffraktometer wurden mit CuK_α-Strahlung von A 1624, von B 1683 unabhängige Reflexe bis zu einem maximalen Streuwinkel von $\vartheta = 65^\circ$ gemessen und mit WILSON-Statistik skaliert.



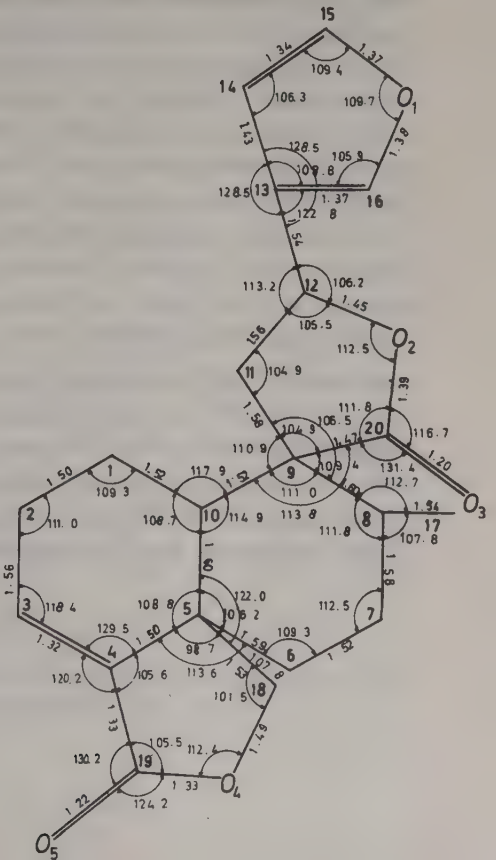


Abb. 23

Bindungswinkel und
Bindungsabstände in
Bacchotricuneatin A und B

Beide Strukturen wurden mit "Direkten Methoden" unter Verwendung des Programmsystems MULTAN 74 bestimmt (84). Dazu wurden für A die Phasen der 175 höchsten sogenannten normalisierten Strukturfaktoren E verwendet. Drei Ursprungs- und fünf Startreflexe, die permittiert wurden und von denen einer zur Festlegung der enantiomorphen Struktur diente, ergaben 128 mögliche Lösungen für die Phasen. Davon zeigte die beste auf Grund des Kriteriums der "combined figure of merit" 24 der insgesamt 25 Atomen an (H ausgenommen). In einer anschließenden Fouriersynthese konnte das verbleibende Atom ermittelt werden. Acht isotrope und anisotrope Verfeinerungszyklen erbrachten einen R-Faktor von 7.5%. Er stellt das Maß für die Genauigkeit der vermessenen Daten dar.

Substanz B bereitete zunächst Schwierigkeiten. Ein Versuch, mit drei Ursprungs- und fünf permittierten Startreflexen die Phasen der 400 größten E-Werte zu bestimmen, brachte keine Lösung mit interpretierbarer Elektronendichtekarte. Nach einem Vorschlag von LESSINGER (85) wurde deshalb die Anzahl der E-Werte auf 200 reduziert, wodurch das Verhältnis Σ_2-Beziehungen/Anzahl E verbessert wird. Bei gleichen Ursprungs- und nur drei weiteren Startreflexen konnten dann die richtigen Lösungen und Lagen aller 25 Atome ohne die Wasserstoffe ermittelt werden. Isotrope Verfeinerung der Lage dieser 25 Atome und anisotrope Verfeinerungszyklen lieferten einen R-Faktor von 9.2%.

Die räumlichen Strukturen beider Verbindungen sind in den Abb. 24 und 25, S. 48, gezeigt. Sie lassen die Transverknüpfungen der in Sesselform vorliegenden AB-Ringe erkennen. Der δ-Lactonring von Substanz A nimmt Bootform ein, der gesättigte γ-Lactonring in Spirostellung bei Verbindung B steht senkrecht zum Decalingerüst.

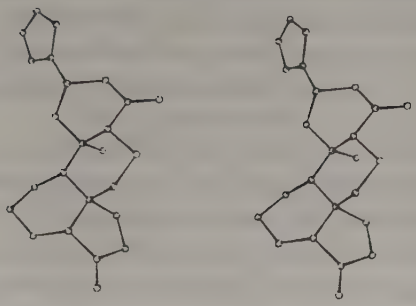


Abb. 24

Stereoskopische Molekülansicht (ohne Wasserstoffe) von Bacchotricuneatin A

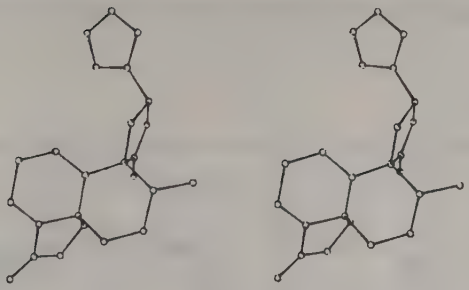


Abb. 25

Stereoskopische Molekülansicht (ohne Wasserstoffe) von Bacchotricuneatin B

3.5 Strukturaufklärung von Substanz C

Die dritte Dragendorff positive Verbindung C (Smp. 188 - 190°C) erwies sich auf Grund ihres MG von 342,1465 (hochauflösendes MS) und der Summenformel $C_{20}H_{22}O_5$ als weiteres Strukturisomeres der Substanzen A und B.
Die optische Drehung konnte wegen der geringen zur Verfügung stehenden Substanzmenge von 4 mg nicht bestimmt werden. Bei der Detektion auf dem Dünnschichtchromatogramm war C trotz ähnlicher Polarität leicht von beiden anderen Substanzen zu unterscheiden, da mit Lactonreagentien eine langsamere, mit Ehrlichs Reagens eine dunklere Färbung auftrat.

3.51 Diskussion der Spektren

Das UV-Spektrum (Abb.9, S. 23) von C ist nahezu identisch mit dem von A oder B: Endabsorption mit Schultern bei 210 (ε = 14500) und 241 (ε = 2310) nm.

Aus den Intensitäten der Massenbruchstücke m/e 95 (78%), 94 (43%) und 81 (82%) können bezüglich der Substitution an der Furanseitenkette keine Schlüsse gezogen werden.

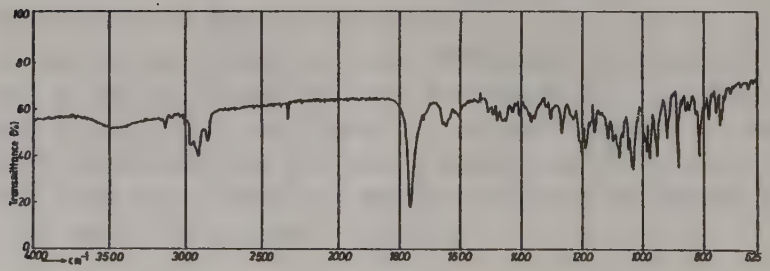


Abb. 26

IR-Spektrum von Bacchotricuneatin C

Das IR-Spektrum (Abb.26, S.49) deutet auf die Anwesenheit eines Furanringes und einer Doppelbindung (Banden bei 3140, 1505, 1430 und 880 bzw. 1645 cm^{-1}), sowie das Fehlen von Hydroxylgruppen hin. Die Carbonylbande bei 1755 cm^{-1} besitzt eine mittlere Intensität.

Das 270 MHz PMR-Spektrum (Abb. 27, S.50) läßt die bekannten Signale des Furanringes (δ = 7.41/7.37/6.37 ppm) und des α,β-ungesättigten γ-Lactonringes erkennen (Teilstruktur ©, s.S. 25: H-3: δ = 6.67 ppm dd 7/2.5 Hz; H-18a: δ = 3.88 ppm dd 8/2 Hz; H-18b: δ = 4.38 ppm d 8 Hz).

Doppelresonanzexperimente bestätigen wiederum das Vorliegen eines Clerodan-Grundgerüstes (s.Tab.4, S. 34) und einer "long range"-Kopplung von 2 Hz zwischen H-18a und H-6a. Methylgruppen fehlen.

Das Triplett mit Zentrum bei δ = 4.95 ppm und einer 7 Hz Kopplung, das in der Lage und Aufspaltung dem von H-12 der Verbindung B ähnelt, ist im Vergleich dazu um 0.5 ppm zu höherem Feld verschoben. Die vicinale Methylengruppe (H-11a,b) resoniert bei 2.17 ppm.

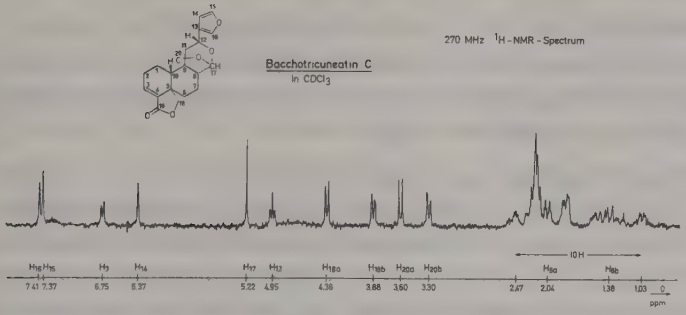


Abb. 27

Neu im Spektrum ist ein zweites AB-System mit Zentrum bei 3.45 ppm (J = 9 Hz), das in der Lage charakteristisch für Methylenprotonen an einer Ätherbindung ist. Sein "upfield"-Signal (δ = 3.3 ppm, 1H, dd) erfährt zusätzlich eine "long range"-Kopplung von 1.5 Hz mit einem Proton bei 2.17 ppm. Da die Einstrahlung bei dieser Frequenz sowohl das dd bei 3.3 ppm zu einem klaren Dublett, als auch das H-12 Triplett zu einem Singulett werden läßt, ist die "long range"-Kopplung des AB-Systems zu H-11 erwiesen.

Neu ist auch ein Ein-Protonensingulett bei 5.22 ppm. Da nach dem IR-Spektrum keine weiteren Carbonylfunktionen zu erwarten sind, kann die starke chemische Verschiebung dieses Signals nur von zwei Sauerstoff-Atomen an einer Methingruppe verursacht werden. Ähnliche Werte sind von Acetal- und Hemiacetalprotonen bekannt (86,87).

3.52 Ableitung der Struktur

Biogenetische Überlegungen führen für Substanz C zu folgendem Strukturvorschlag.

Die für ein Clerodan-Skelett geforderten Methylgruppen an C-8 und C-9 müssen beide in oxidierter Form vorliegen, die eine als primärer Alkohol, die andere als Aldehyd, dieser jedoch in seiner Acetalform, wie das ^{1}H-NMR-Spektrum erkennen läßt.

Unter Ausbildung zweier Ringe schließt sich die Acetalgruppe zum primären Alkohol und zur bereits bekannten sekundären OH-Gruppe am C-12.

Mit dieser Annahme kann der "upfield shift" von H-12 befriedigend erklärt werden, der in der Größenordnung mit dem eines Protons an sekundären Alkoholen vor und nach der Acetylierung vergleichbar ist. Auch sind damit alle Sauerstoffatome der Summenformel $C_{20}H_{22}O_5$ und die geforderten zehn Doppelbindungsäquivalente erklärt, da hier anstelle der für die Verbindungen A und B charakteristischen zweiten Carbonylgruppe zwei Acetalsauerstoffe und ein weiterer Ring vorliegen.

Auf Grund der "long range"-Kopplung zu H-11 und fehlender vicinaler Protonen kann die $-CH_2-O-$Brücke des AB-Systems nur mit dem C-9 verknüpft sein. Die Acetalgruppe muß aus dem C-17-Methyl gebildet worden sein.

Daraus läßt sich für Bacchotricuneatin C folgende Konstitution ableiten:

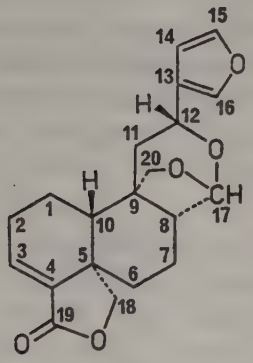


Abb. 28

Stereostruktur von Bacchotricuneatin C

Studien am Dreiding-Molekülmodell machen deutlich, daß Verbindung C nur in einer einzigen sterischen Form konstruierbar ist, die wiederum mit der relativen Konfiguration von A und B in allen Zentren übereinstimmt.

Damit ist auch der Widerspruch im ^{1}H-NMR-Spektrum geklärt, in dem das H-17 Signal trotz benachbartem H-8 als Singulett erscheint. Das Modell zeigt, daß der Diederwinkel zwischen H-8 und H-17 81° beträgt, woraus sich eine verschwindend kleine vicinale Kopplung von 0.17 Hz ableitet (88).

Wegen der geringen Menge von C konnten keine weiteren chemischen und spektroskopischen Strukturbeweise durchgeführt werden.

Bacchotricuneatin C kann biogenetisch als oxidative Vorstufe der Verbindungen A oder B angesehen werden. Bisher ist erst ein Clerodan-Diterpen (Teucrin P_1) mit einer vergleichbaren Acetalgruppierung aus Teucrium polium isoliert worden (89).

Erwähnt werden müssen in diesem Zusammenhang auch Cascarillin, ein Bitterstoff aus Croton eleuteria (90), Aldehydomarrubialacton aus Leonuris marrubiastrum (65) und Olearin aus Olearia heterocarpa (63), in denen einzelne Strukturelemente der Acetalgruppierung auf einer früheren Oxidationsstufe präformiert vorliegen.

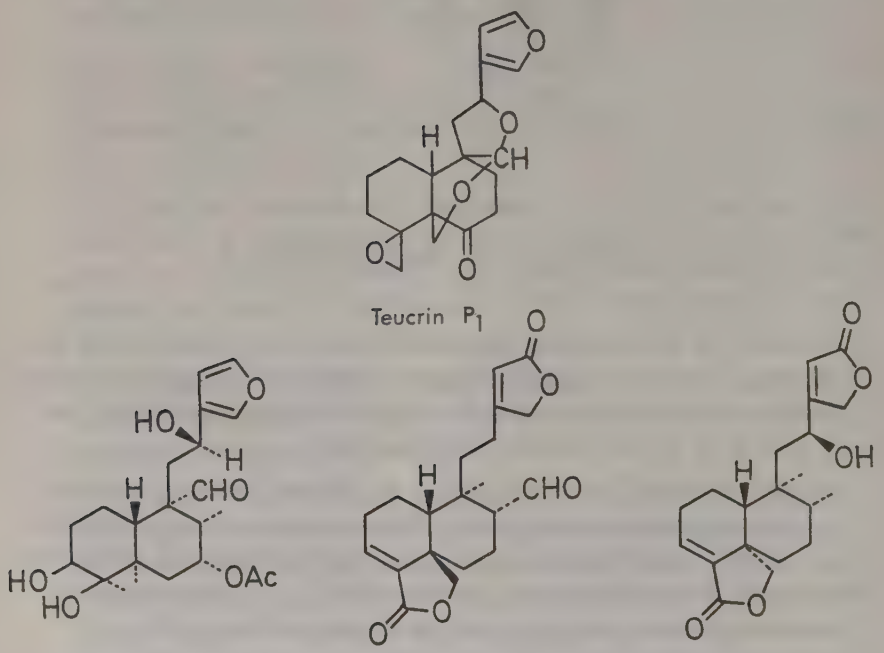


Abb. 29

3.6 Strukturaufklärung von D

Für Bacchotricuneatin D (Smp. 109 - 111°C) errechnet sich aus der Massenfeinbestimmung und der CH-Analyse ein Molekulargewicht von 318.2187, was der Summenformel $C_{20}H_{30}O_3$ und 6 Doppelbindungsäquivalenten entspricht. Die optische Drehung beträgt in Chloroform -74.1° bei einer Konzentration von 0.581.

Im Dünnschichtchromatogramm läßt sich die stark polare Verbindung nur mit Ehrlichs Reagens detektieren. Eine ähnliche, dunkelviolette Färbung war beim Besprühen des zu Vergleichszwecken isolierten Labdanditerpens Marrubiin aufgefallen, dessen Molekül einen Furanring mit unsubstituierter Seitenkette aufweist.

Eine Erklärung für das unterschiedliche Verhalten der Verbindungen A und B bzw. C und D (vgl.Tab.2, S. 17) gegen Ehrlichs-Reagens könnte sein, daß offensichtlich die elektrophile Substitution des p-Dimethylaminobenzaldehyd an den Furanring durch den elektronegativen Einfluß der allylständigen Lactonringe in A und B erschwert wird, so daß hier erst sehr langsam eine Farbintensivierung eintritt, während sie Verbindungen mit unsubstituierter Seitenkette sofort zeigen.

3.61 Diskussion der Spektren

Im UV-Spektrum (Abb.32, S. 58) tritt diesmal nur die starke Endabsorption des Furanringes in Erscheinung. Sein Vorliegen wird wieder durch die Banden bei 3090, 1490 und 870 cm^{-1} im IR-Spektrum (Abb.30) bestätigt. Die eher schwache Absorption bei 1600 cm^{-1} kann einer isolierten Doppelbindung zukommen. Carbonylbanden fehlen. Deutlich sind die Schwingungen zweier Hydroxylgruppe bei 3500 und 3400 cm^{-1} zu identifizieren.

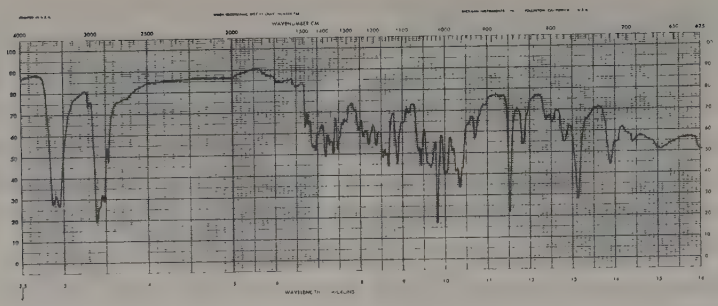


Abb. 30

IR-Spektrum von Bacchotricuneatin D

Erwartungsgemäß erscheint im Massenspektrum erstmals das Bruchstück $M^+ - 18$ (H_2O). Die Intensitäten der Fragmente m/e 95 (13%), 94 (11%) und 81 (66%) lassen, wie auch die Ehrlichs Reaktion, auf eine unsubstituierte Seitenkette schließen (73).

Zusätzlich zu den Signalen des Furanringes (δ = 7.34/7.18/6.24 ppm) erscheint im Protonenresonanzspektrum (Abb. 31) im olefinischen Bereich nur noch das Multiplett eines Protons bei 5.51 ppm ($W_{1/2}$ = 9 Hz), das offensichtlich an einer isolierten Doppelbindung lokalisiert ist. Die benachbarten Methylensignale werden bei 1.53 und 2.22 ppm identifiziert. Zwei Singulette bei 1.36 und 1.02 ppm und ein Dublett bei 1.04 ppm (J = 7 Hz), die für drei H-Atome integrieren, lassen zwei tertiäre und eine sekundäre Methylgruppe erwarten.

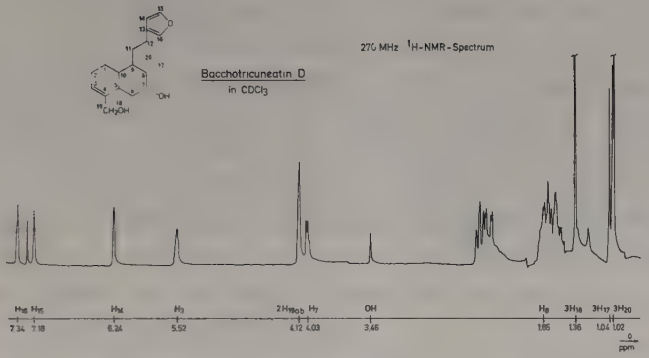


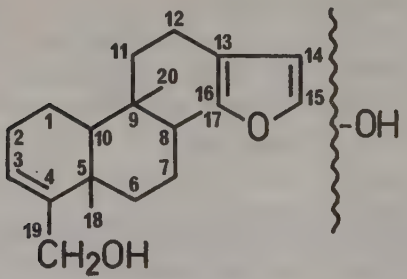
Abb. 31

Neben einem auf D_2O-Zugabe verschwindenden Signal bei 3.46 ppm bestätigen zwei Resonanzen im Bereich von Protonen an OH-tragenden Kohlenstoffen den Diolcharakter von Verbindung D. Davon integriert das breite Singulett bei 4.12 ppm für zwei Protonen und erfährt bei der Acetylierung den für primäre OH-Gruppen charakteristischen "downfield shift" von 0.38 ppm.

Das 1H-Multiplett bei 4.03 ppm mit einer Halbbreite von 9 Hz zeigt eine weitere, sekundäre Hydroxylgruppe im Molekül an.

3.62 Ableitung der Struktur

Bei der Einstrahlung an dem verbreiterten Methylensignal der primären OH-Gruppe löst sich das Multiplett bei 5.52 ppm zu einem klaren Triplett auf und zeigt damit eine allylische Kopplung von 1 Hz an. Daraus ist ersichtlich, daß in dem aller Wahrscheinlichkeit nach vorliegenden Clerodan-Skelett nur die ursprüngliche Methylgruppe an der Δ 3,4-Doppelbindung zum primären Alkohol oxidiert worden sein kann. Zwei anguläre und eine sekundäre Methylgruppe vervollständigen das Grundgerüst.



Die Lokalisierung der sekundären OH-Gruppe gelang auf einfache Weise. Durch Entkopplung des H-17 Methyldubletts wurde H-8 bei 1.65 ppm definiert (s.Tab.4, S. 34). Bei dessen Gegeneinstrahlung vereinfachte sich das Multiplett bei 4.03 ppm zu einem Doppeldublett (J = 6 / 2.5 Hz) und zeigte damit die Lage des Hydroxyls am C-7 an. Aus den kleinen vicinalen Kopplungen (ea, ee) zu H-6 a,b im H-8-Einstrahlungsspektrum resultiert eine äquatoriale Lage für das H-7. Die OH-Gruppe steht axial.

3.63 Derivate von D

Zusätzliche Beweise für die richtige Position der sekundären Hydroxylgruppe lieferte seine Oxidation zum Keton (4c). In dessen PMR-Spektrum (s.Tab.4, S. 34) erscheint H-8 als isoliertes Quartett (J = 7 Hz), durch den Einfluß der benachbarten Carbonylgruppe zu 2.66 ppm nach tieferem Feld verschoben. Gleichzeitig beobachtet man hier einen auffallenden "upfield shift" aller Methylsingulette (s.Tab.8,S.59), besonders der angulären am C-5 und C-9. Dieser ist nur so zu erklären, daß durch die Oxidation der axial α-ständigen OH-Gruppe am C-7 ihr Entschirmungseinfluß auf die demnach gleichgerichteten axialen Methylsubstituenten am C-9 und C-5 aufgehoben wird (13,91).

Chemischer Beweis einer primären Alkoholgruppe ist ihre selektive Oxidation zum Aldehyd mit Mangandioxid. Nach achtstündiger Reaktion erhielten wir aus D ein Reaktionsprodukt (4d) mit einer konjugierten Aldehydfunktion (IR-Bande bei 1680 cm^{-1}), womit die Position der CH_2OH-Gruppe am C-4 bestätigt war. Im PMR-Spektrum des Aldehyds (4d) ist H-3 wieder nach 6.55 ppm (dd, J = 5/4 Hz) verschoben, wie bei den Verbindungen A mit C. Das acide Aldehydproton resoniert bei 9.3 ppm als breites Singulett (s.Tab.4, S. 34).

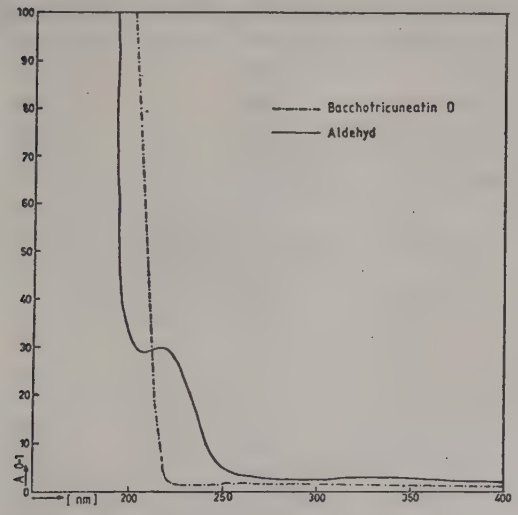


Abb. 32

UV-Spektrum von Bacchotricuneatin D und dem Aldehyd (4d)

Im UV-Spektrum des Aldehyds (Abb. 32, S. 58) wird die Endabsorption der Ausgangsverbindung D nun von dem Maximum des neu eingeführten α,β-ungesättigten Aldehydchromophors (92) bei 217 nm (ε = 10800) überlagert. Die UV-Interpretation der Verbindungen A mit C wird dadurch bestätigt.

Jetzt wieder auftretende Löschung im DC bei 254 nm und positive Dragendorff-Reaktion muß ebenfalls auf die Einführung der konjugierten Aldehydgruppe zurückgeführt werden. Die von FARNSWORTH postulierte Mindestvoraussetzung für eine positive Dragendorff-Reaktion bei fehlendem Stickstoff trifft demnach auch für den vorliegenden Verbindungstyp zu (47).

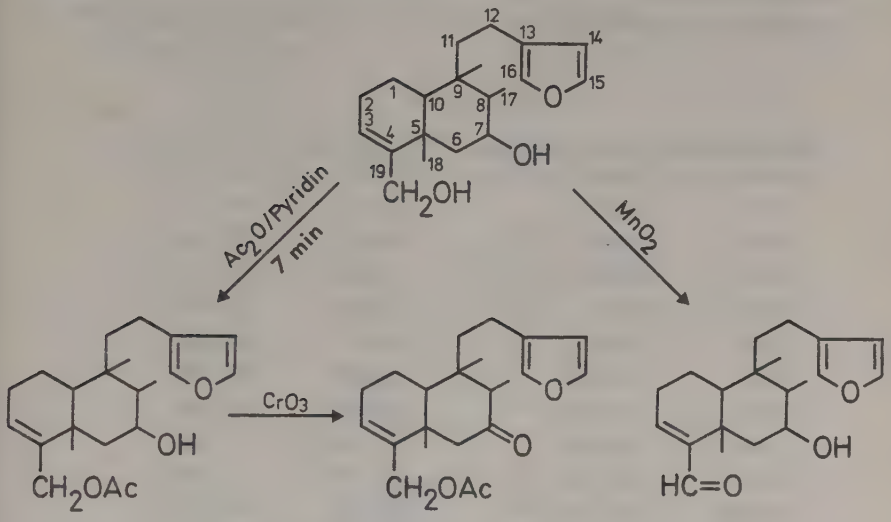
Eine eindeutige Zuordnung der PMR-Methylsignale von Bacchotricuneatin D war durch Vergleich der chemischen Verschiebungen nach der "Monoacetylierung" (4b) und der Aldehyd- bzw. Ketonoxidation möglich. Bei der Aufnahme des Aldehydspektrums zeigt nur das C-18 Methyl eine anisotrope Verschiebung durch die Carbonylgruppe am C-19 (s.Tab.8).

T a b e l l e 8

Vergleich der chemischen Verschiebung der Methylgruppen in den ^{1}H-NMR-Spektren von D und Derivaten
(δ in ppm, $CDCl_3$, 270 MHz)

von:	C-18 Methyl(s)	C-20 Methyl(s)	C-17-Methyl(d)
D (4a)	1.36	1.02	1.04
Aldehyd (4d)	1.45	1.02	1.05
Monoacetat (4b)	1.34	1.02	1.05
Monoacetatketon (4c)	1.06	0.75	0.97

Bacchotricuneatin D (4a)



Monoacetat (4b) Monoacetatketon (4c) Aldehyd (4d)

Abb. 33

Derivate von Bacchotricuneatin D

3.64 ^{13}C-NMR-Spektroskopie von D

Letzte Bestätigung der postulierten Konstitution von D lieferte das "off resonance" ^{13}C-MR-Spektrum (s.Abb.34 u. Tab.9), das für alle 20 Kohlenstoffe die entsprechenden Signale erkennen ließ. Auch hier ermöglichten Vergleiche mit Daten aus der Literatur eine weitgehend gesicherte Zuordnung (13,79,93-95).

Tabelle 9

Kohlenstoff-13-Zuordnungen für Bacchotricuneatin D

C-1	18.3t	C-11	42.3t
C-2	26.4t	C-12	17.3t
C-3	121.6d	C-13	125.4s
C-4	148.5s	C-14	110.9d
C-5	38.2s	C-15	142.0d
C-6	39.6t	C-16	138.4d
C-7	73.5d	C-17	12.5q
C-8	39.2d	C-18	23.3q
C-9	37.2s	C-19	63.0t
C-10	46.4d	C-20	19.9q

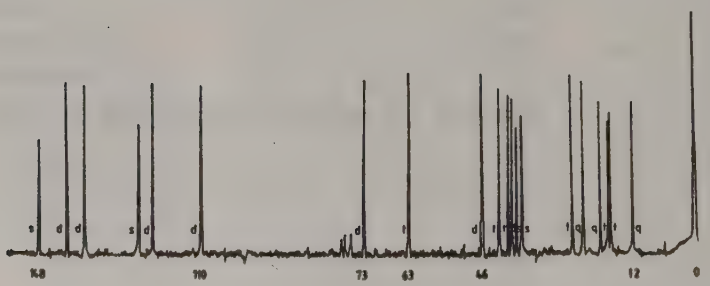


Abb. 34
^{13}C-NMR-Spektrum von Bacchotricuneatin D

Die Lage des Signals für C-17 bei 12.5 ppm spricht für eine äquatoriale Methylgruppe (94), was auch schon die Halbbreite von 9 Hz des H-7-Signals im ^{1}H-NMR-Spektrum von D andeutete. Sie setzt sich aus den vergleichsweise kleinen Werten von ea-, ee- und ea-Kopplungen zusammen.

Damit ist auch die Konfiguration am C-8 geklärt und es kann für Bacchotricuneatin D folgende relative Stereostruktur abgeleitet werden:

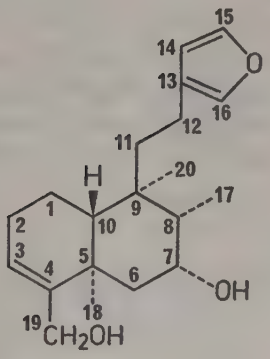


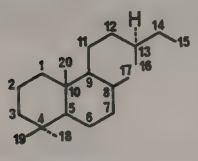
Abb. 35

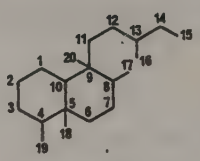
Stereostruktur von Bacchotricuneatin D

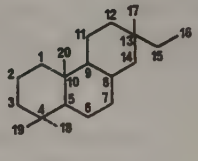
3.7 Zur Stereochemie der Clerodan-Diterpene A mit D

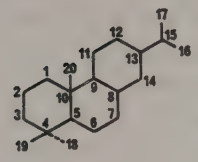
3.71 Allgemeine biogenetische Voraussetzungen

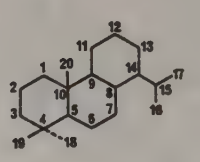
Nach HANSON (96,97) bilden Diterpene die große Klasse von C_{20}-Verbindungen, die sich trotz der strukturellen Vielfalt (vgl.Abb.36) auf ein gemeinsames biogenetisches System zurückführen lassen.

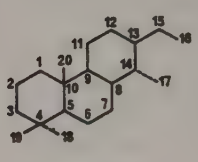

Labdan

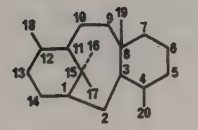

Clerodan

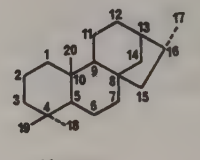

Pimaran

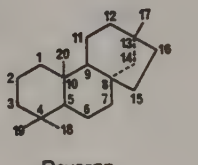

Abietan

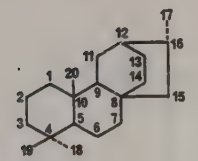

Totaran

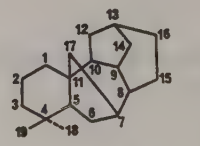

Cassan

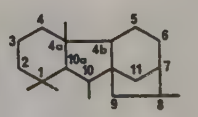

Taxan


Kawan


Beyeran


Atisan


Aconan


Gibban

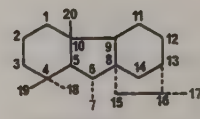

Gibberellan

Abb. 36

Typische Diterpengerüste

Sie alle entstehen durch schrittweise Cyclisierungs- und nachfolgende Umlagerungsreaktionen aus der aus vier Isopreneinheiten (98,99) aufgebauten Precursorsubstanz Geranylgeranylpyrophosphat (oder des Isomeren Geranyllinalyl-P.P.). Da die Cyclisierung erst nach Protonierung der Doppelbindungen erfolgt, beobachtet man bei Diterpenen im Gegensatz zu Triterpenen und Steroiden keine konstante Stereochemie, sondern - ein Charakteristikum dieser Klasse - normale und antipodische Ringverknüpfungen (100,101). Die sogenannte Normalverknüpfung wird auf die optische Serie der Steroide bezogen (mit 10 β-Me).

Das Clerodan-Skelett entwickelt sich nachträglich aus der ersten Cyclisierungsstufe Labdan (102).
Verbunden mit Hydridshifts bewirkt die initiierende Protonierung an der C-8 Doppelbindung Methylwanderungen von C-10 zu C-9 und C-4 zu C-5 (siehe Abb. 37), wobei die wandernden Gruppen immer in transdiaxialer Beziehung zueinander stehen (genannt "backbone" - oder "friedo" rearrangement) (96).

Biosyntheseschema der Clerodanditerpene

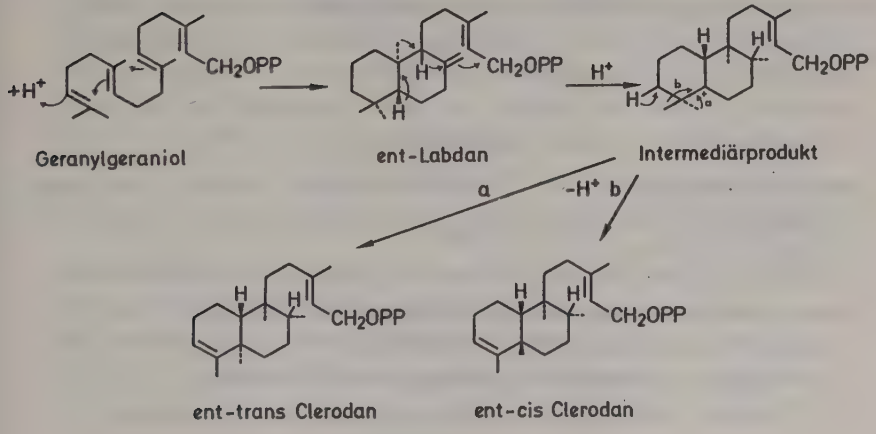


Abb. 37

Vermutlich abhängig von den Bindungs- und Lösungsvorgängen der Intermediärprodukte am Enzym können dabei cis- und transverknüpfte Ringe entstehen (102).

Demnach unterscheidet man vier sterische Modifikationen des Clerodan-Gerüsts:

normal - Serie:	norm-	trans-	10α H	5β Me
		cis	10α H	5α Me
enantio-Serie:	ent-	trans	10β H	5α Me
		cis	10β H	5β Me

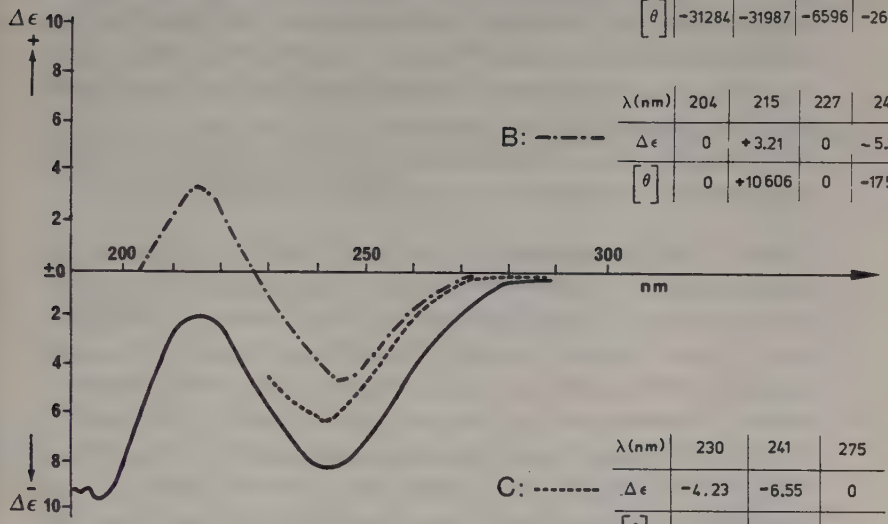
3.72 Bestimmung der absoluten Konfiguration

Über die absolute Konfiguration macht die übliche Röntgenstrukturanalyse keine Aussage. Zu ihrer Bestimmung vergleicht man den Cottoneffekt der Circulardichroismuskurve mit dem bereits bestimmter Verbindungen derselben Stoffklasse oder analoger Strukturen.

Wie auch die Diterpene aus B.trimera (13) zeigen Bacchotricuneatin A mit C in ihren Circulardichrogrammen eine stark negative Bande bei 240 - 245 nm (vgl.Abb.38, S.66). Sie wird von dem $n-\pi^*$ Übergang (R-Bande) des α,β-ungesättigten γ-Lactons verursacht und steht in Lage und Vorzeichen in Übereinstimmung mit den CD-Kurven von Methylbarbascoat (103) und (-)Methylhardwickiat (104).

Bacchotricuneatin A mit C zählen demnach ebenfalls zu den Clerodanen der enantio-Serie mit transverknüpften Ringen.

Da sich der CD bei 215 nm aus der K-Bande des ungesättigten γ-Lactonringes und der R-Bande der gesättigten Lactonringe (5- oder 6-gliedrig) zusammensetzt, kann dieser Bereich nicht verbindlich interpretiert werden.



A: ——

λ	190	195	216	241	282
Δε	-9.48	-9.693	-1.99	-8.18	0
[θ]	-31284	-31987	-6596	-26992	0

B: -·-·-

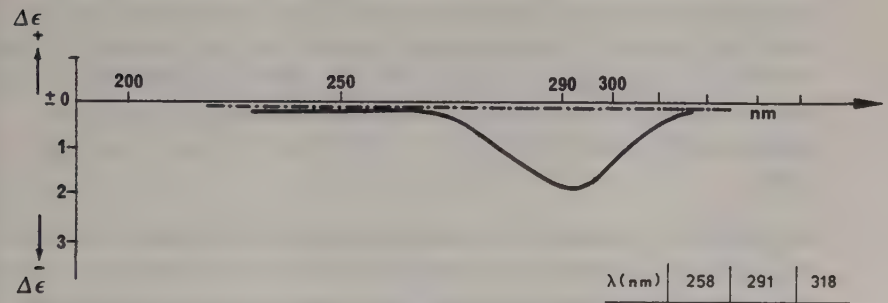
λ(nm)	204	215	227	245	288
Δε	0	+3.21	0	-5.321	0
[θ]	0	+10606	0	-17559	0

C: ·····

λ(nm)	230	241	275
Δε	-4.23	-6.55	0
[θ]	-13961	-21640	0

Abb. 38

CD-Kurven von Bacchotricuneatin A,B,C



Keton (4c): ——

λ(nm)	258	291	318
Δε	0	-1.86	0
[θ]	0	-6150	0

D (4a): -·-·-

Abb. 39

CD-Kurven von Bacchotricuneatin D und seinem Keton (4c)

Für eine R-Konfiguration am C-12, wie sie sich aus der Kombination von absoluter Konfiguration und Röntgenstrukturanalyse ableiten läßt, ergibt sich für Bacchotricuneatin A nach der Wolf-schen Lactonregel (105) in diesem Bereich ein negativer CD. Tatsächlich findet man bei A nicht mehr den positiven Cottoneffekt bei 216 nm wie in Bacchotricuneatin B, sondern ein negatives Minimum (106).

D zeigt erwartungsgemäß keinen Cottoneffekt, da die Assymetriezentren zu weit vom einzigen Chromophor Furan entfernt sind. Die CD-Kurve ist nur eine Gerade (s.Abb.39, S.66). Zwar kann mit großer Wahrscheinlichkeit eine gleiche absolute Konfiguration aller Bacchotricuneatine erwartet werden, jedoch wird von HANSON (102), EKONG (107) und CAPUTO (108) auch über das gleichzeitige Auftreten von Diterpen-Verbindungen der normal- und enantio-Serie in einer Pflanze berichtet. Ebenso ist das Vorliegen von cis- und trans-verknüpften Ringen der gleichen Grundskelette nebeneinander bekannt (65).

Zum Konfigurationsbeweis von D wurde die OH-Gruppe am C-7 zum Keton oxidiert, nachdem zuvor durch selektive Acetylierung die primäre Alkoholgruppe am C-4 vor der Oxidation zum "störenden" Aldehyd geschützt worden war (vgl.Abb.33,S. 60). Der neu eingeführte Ketonchromophor verursacht nun einen negativen Cottoneffekt ($\Delta\varepsilon$ = -1.86) bei 291 nm (s.Abb.39, S.66).

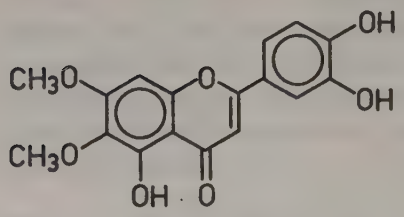
Die axiale Anordnung der Substituenten am C-5 und C-9, wie sie aus der ^{1}H-NMR-Spektroskopie von D hervorgeht (vgl. S.58) ist sowohl vereinbar mit dem ent-trans-Gerüst aller Baccharis-Clerodane, wie auch mit einer norm-cis-Anordnung (5α-Me, αH-10). Modellversuche und Übertragung beider Varianten in das Oktantendiagramm (109) zeigen, daß letztere einen sehr kleinen negativen bis schwach positiven Effekt erwarten läßt, während für die ent-trans-Version tatsäch-

lich der relativ starke negative Effekt auftreten muß, wie ihn das D-Keton (4c) zeigt und wie er auch von KIRK und KLYNE (110) für t3'-Decalone mit gleicher absoluter Konfiguration gefunden wurde.

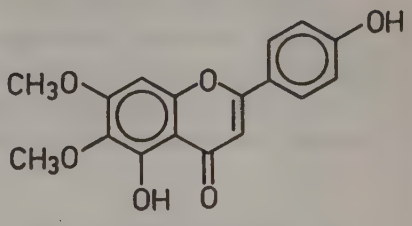
Auch Bacchotricuneatin D besitzt demnach die Konfiguration eines ent-trans-Clerodans.

3.8 Strukturaufklärung bzw. Identifizierung der phenolischen Verbindungen

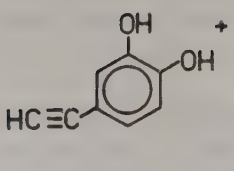
Durch ^{1}H-NMR-Spektren, charakteristische Massenfragmente (Abb.40) und Verschiebungen der UV-Maxima nach Zugabe von Shiftreagenzien, die mit den Literaturangaben in Übereinstimmung waren, wurden die Flavone F_1 als Cirsiliol (111, 112) (6,7-Dimethoxy-5,3',4'-trihydroxyflavon) und F_2 als Cirsimaritin (113,114) (5,4'-Dihydroxy-6,7-dimethoxyflavon) identifiziert (s.Tab.14/15,S.111/112).Auch ihre Schmelzpunkte erwiesen sich annähernd identisch mit denen aus der Literatur.



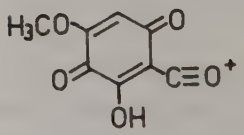
Cirsiliol



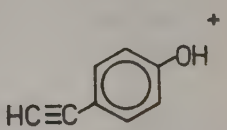
Cirsimaritin



m/e 135



m/e 181



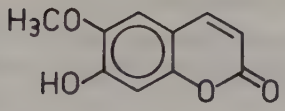
m/e 116

Abb. 40

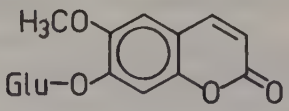
Charakteristische Massenfragmente von Cirsiliol und Cirsimaritin

Auf Grund chromatographischer Vergleiche und des unveränderten Mischschmelzpunktes mit der authentischen Probe konnte das Hauptcumarin S_1 als Scopoletin identifiziert werden. Sein UV-Spektrum zeigt die typischen Maxima bei 229, 253, 296 und 345 nm, die IR-Spektren sind deckungsgleich.

Salzsaure Hydrolyse des Eluats der Cumarinzone S_2 ergab Scopoletin und Glucose als Zuckeranteil. S_2 konnte nach DC-Vergleich mit authentischem Scopolin als Cichoriin-6-monomethyläther bestimmt werden (s.Tab.16, S.113).

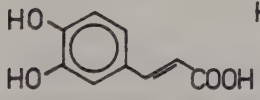


Scopoletin

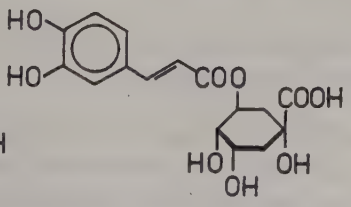


Scopolin

Im Methanolextrakt ließen sich durch Vergleich mit den entsprechenden Testproben auf Kieselgel- und Polyamidschichten in wechselnden Laufmittelsystemen die ubiquitär im Pflanzenreich verbreitete Kaffeesäure und Chlorogensäure nachweisen (s.Tab.17, S.114).



Kaffeesäure



Chlorogensäure

4.0 Pharmakologische Untersuchungen

Inwieweit die von Baccharis tricuneata berichteten Wirkungen bei Tumor- und Virus-Infektionen wissenschaftlich belegt werden können, sollten folgende pharmakologische Untersuchungen zeigen.

4.1 Screening auf Antitumor-Wirksamkeit von Baccharis-Extrakten

Äthanol- (A) und Chloroformfraktionen (B) von Baccharis tricuneata, nach einer Vorschrift des National Cancer Instituts, Bethesda, Maryland, U.S.A., hergestellt, wurden dort einem Screening-Verfahren zur Prüfung auf Antitumor-Wirksamkeit der Drogenextrakte unterzogen (115).

Die Untersuchungen erfolgten an 2 Tumorsystemen:

a) in vitro an Zellkulturen des KB-Systems, das aus humanem Nasopharynx-Epidermis Carcinom in Eagle's Basalmedium kultiviert wurde.

b) in vivo im P 388-System an Mäusen mit Lymphozyten-Leukämie.

Zur in vitro Prüfung am KB-System werden Tumorzellkulturen mit dem zu untersuchenden Extrakt beschickt, während in Parallelversuchen Kontrollkulturen nur mit Trägerlösung versetzt werden. Die Ergebnisse werden in der Dosis (ED 50) ausgedrückt, die nach drei Tagen am Testsystem im Vergleich zum Kontrollsystem eine 50%ige Wachstumshemmung hervorruft.

Aktivitätskriterium ist für Pflanzenextrakte eine
ED 50 $\leq$ 30 µg/ml.

Beide Baccharis-Fraktionen zeigten eine ED 50 $>$ 100 µg/ml und somit keine Hemmeffekte.

Der in vivo-Test am P 388-System erfolgte an weiblichen, mit Tumor induzierten Mäusen, die an aufeinanderfolgenden Tagen mit wechselnden Konzentrationen von Testmaterial injiziert wurden. Eine Kontrollgruppe analog vorbehandel-

ter Versuchstiere erhielt nur das reine Trägermaterial appliziert.

Als Parameter dieses sogenannten "Survival Tumor Systems" gilt der Quotient aus der mittleren Überlebensdauer der Testgruppentiere (T) und der Kontrollgruppentiere in Prozentangaben. Das Testmaterial gilt als aktiv bei einem $T/C \geqq 125\%$ in zwei aufeinanderfolgenden Testschritten, durchgeführt an mindestens zwei verschiedenen Extraktproben.

Die Chloroformfraktion (B) von Baccharis tricuneata schied bereits in den beiden ersten Testschritten als inaktiv aus:

T/C: 103% und 113%

Die Äthanolfraktion ergab Werte, die um die Kriteriumsgrenze schwankten. Sie wurde daher zur Bestätigung zwei weiteren Testdurchgängen unterzogen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 10, S. 73, wiedergegeben.

Die nachweisbare Wirkung genügte nicht den geforderten Aktivitätskriterien für die Inangriffnahme weiterer Untersuchungen. Eine schwache Antitumor-Aktivität war somit nicht auszuschließen.

Tabelle 10

Ergebnisse der Antitumortestung am P 388-System der Äthanolfraktionen (A) von Baccharis tricuneata

Probe	Anzahl der Inj.	Dosis/Inj. mg/kg	Tumorbewertung Testgruppe	Tumorbewertung Kontrollgruppe	T/C in %
Äthanol-fraktion 7.9.77	9	400	11.0	9.2	119
	9	200	11.7	9.2	127
	9	100	10.2	9.2	110
Äthanol-fraktion 14.4.78	9	600	0.0	8.1	-
	9	400	10.0	8.1	123
	9	200	9.8	8.1	120
	9	100	9.1	8.1	112
	9	50	9.0	8.1	111
	9	25	8.3	8.1	102
Äthanol-fraktion 1.9.78	9	600	0.0	9.9	-
	9	400	0.0	9.9	-
	9	200	10.8	9.9	109
	9	100	10.8	9.9	109
	9	50	10.1	9.9	102
	9	25	9.8	9.9	98

4.2 In-vitro-Prüfung von Extraktfraktionen auf Hemmung der ^{3}H-Thymidin-Einbauraten in Asciteszellen

Als weiteres Verfahren zur Untersuchung der cytostatischen Aktivität eines Drogenauszuges kann die Bewertung der Hemmung der DNA-Synthese von Tumorzellen herangezogen werden (116,117). Als Kriterium dient die Beeinflussung der Einbauraten von ^{3}H-Thymidin in Asciteszellen von Walker-256-Carcinosarkomen bei Ratten.
Die Methodik des Verfahrens wurde nach WEITZEL und SCHNEIDER (118) modifiziert (siehe Experimenteller Teil, S.116).

Zur Untersuchung gelangte der in weitere vier Fraktionen unterteilte, bereits im NCI-Screening untersuchte Äthanolextrakt A.

Durch Verteilungs- und Perforationsschritte war er in eine n-Hexan- (C), Äther- (D), Äthylacatat- (E) und Wasser-lösliche (F)-Fraktion aufgetrennt worden.

Bei einer Höchstkonzentration von 2 mg/ml Extraktzugabe in vitro zum Asciteszellmedium zeigte die Äthylacetatfraktion (E) eine Hemmwirkung von durchschnittlich 10% im Vergleich zum Kontrollsystem, während die drei weiteren Extraktfraktionen C, D und F keine Hemmwirkung aufwiesen.

Die Ergebnisse stehen somit mit den Ergebnissen der Testung am P 388-System in Einklang.

4.3 In vitro-Untersuchung im Zellkulturversuch auf Virus-hemmende Wirkung

Ein Äthanolextrakt von Baccharis tricuneata wurde in der Zusammensetzung, wie er in der einheimischen Medizin bei fieberhaften, grippalen Infekten zur Anwendung gelangt, im Zellkulturversuch auf Virus-hemmende Wirkung untersucht.

Als "in vitro"-Modell wurde der Zellstamm "Girardi Heart Flow" benutzt. Dieses Medium hat sich für die Kultur zahlreicher Viren als geeignet erwiesen.

Geprüft wurde die Wirkung von Baccharis tric. gegenüber Adenovirus Typ 6. Dieser Virus gehört zur Gruppe der DNS-Viren und verursacht vor allem Erkrankungen der Luftwege (119). Die von ihm erzeugten degenerativen Veränderungen an Wirtszellen sind gut beschrieben (120,121).

Ein allgemein zu beobachtendes Merkmal bei Adenovirus-infizierten Zellen besteht in einer progressiven Verdichtung des Chromatins an der Kernmembran sowie in einer randständigen Verlagerung der Nukleoli. Spezifisch sind bänderartige Strukturen, die nach der Infektion in den Kernen als Ringe oder Rosetten auftreten. Ebenfalls lichtmikroskopisch erkennbar sind die sogenannten Viruskristalle, eine Anhäufung von Adenovirus-Capsiden im Kern der Wirtszelle.

Die Reaktion zwischen Zellkultur und Virus wird durch mikroskopische Charakterisierung des Zellrasens registriert:

Stufe 0 = keine Schädigung: dichte, geschlossene Zellverbände.

Stufe 1 = geringe Schädigung: gelockertes Wachstum der Zellverbände, Einschlußkörper.

Stufe 2 = starke Schädigung: Zellen lösen sich vom Boden des Gefäßes und "kugeln" sich ab.

Stufe 3 = sehr starke Schädigung: Zellstrukturen weitgehend oder vollkommen zerstört.

Gleichzeitig wird dieses Bewertungsschema auch angewendet zur morphologischen Feststellung der toxischen Wirkung einer Droge.

Der Drogenextrakt wurde in abgestufter Konzentration dem Zellkultur-Nährmedium hinzugegeben und das Zellwachstum und somit die Cytotoxizität der Droge nach 4 (a) und 6 (b) Tagen bewertet. Bis zu einer Konzentration von 10^{-3} g/Droge zeigte sich eine starke, von 10^{-4} - 10^{-5} g/Droge eine schwache Cytoxizität.
Wurde den Ansätzen bei Versuchsbeginn eine Virussuspension bekannter Teilchenzahl hinzugefügt (c), so zerstörte diese den Zellrasen im Bereich von 10^{-6} - 10^{-7} g/Droge sowohl nach 4 und 6 Tagen weitgehend, ab 10^{-8} g/Droge vollständig. Zwischen 10^{-4} und 10^{-5} g/Droge war bei verminderter Toxizität der Substanz eine Hemmung der Virusaktivität zu erkennen.
Bei Wiederholung dieses Versuchs im Plaque-Reduktionstest, bei dem die Virussuspension zunächst eine Stunde mit den Drogenverdünnungen bei +37°C inkubiert und anschließend auf vorbereitete Zellkulturen übertragen wurden (d), ergab sich eine Virushemmung bei 10^{-2} - 10^{-5} g/Droge. Dabei ist zu beachten, daß bis 10^{-3} g/Droge zugleich eine cytotoxische Wirkung vorliegt.
Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in Tabelle 11, S.77, wiedergegeben.

Die beobachtete Virus-hemmende Wirkung des Baccharis-Äthanolextraktes, speziell im Konzentrationsbereich 10^{-4} - 10^{-5}, müssen jedoch im Tierversuch noch abgesichert werden.

Tabelle 11

Ergebnisse der in vitro-Untersuchung* auf Virus-hemmende Wirkung eines Baccharis-Äthanolextraktes

Versuchs-ansatz	einwirkende Substanz g/Droge									Kontroll-gruppe
	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	10^{-9}	10^{-10}	0
a	3	3	1	1	0	0	0	0	0	0
b	3	3	2	1	0	0	0	0	0	0
c	3	3	1	1	2	2	3	3	3	3
d	3	3	0	1	2	3	3	3	3	3

* Versuchsansatz mit Virus Adeno Typ 6 auf Zellstamm "Girardi Heart Flow"; Zahl der Virusteilchen = 5×10^6; einwirkender Drogenextrakt = g x 10^{-2} - 10^{-10}

4.4 Diskussion

Die durchgeführten pharmakologischen Untersuchungen lassen erkennen, daß die volksmedizinische Anwendung von Baccharis tricuneata bei Tumor- und Virus-Infektionen nicht unbegründet ist. Inwieweit jedoch zwischen den von uns isolierten Verbindungen und den einzelnen Indikationsbereichen der Drogenzubereitungen Zusammenhänge bestehen, läßt sich aus den bisherigen Untersuchungen nicht ableiten.

Die Äthylacetatfraktion, die als einzige eine Hemmung der ^{3}H-Thymidin-Einbauraten und somit cytocide Aktivität aufwies, besitzt einen besonders hohen Flavonanteil. Bis heute sind bereits eine Zahl von cytotoxischen Verbindungen dieser Substanzklasse bekannt. Neben den erwähnten Tumor-hemmenden Flavonoiden aus Baccharis sarothroides (19) isolierten KUPCHAN und Mitarb. auch aus Eupatorium-Arten cytotoxisch

aktive Flavone und Flavonole (122,123,124). Es handelt sich dabei um Verbindungen, die durch eine ziemlich ungewöhnliche 6,7-Dimethoxy-Substitution gekennzeichnet sind, wie sie auch die von uns isolierten Flavone Cirsimaritin und Cirsiliol aufweisen.

Auch in der Reihe der Diterpene sind Verbindungen mit Tumorhemmenden, antibiotischen und insekticiden Wirkungen beschrieben (125,100), doch leiten sich diese durchweg von anderen Grundgerüsten ab, als sie bei Bacchotricuneatin A mit D vorliegen. Außerdem zeigt speziell die Chloroform-Fraktion (B), in der laut DC die isolierten Diterpene angereichert vorliegen, keine Tumor-Hemmwirkung.

Aus der Clerodan- und der nah verwandten Labdanditerpen-Reihe sind eine Anzahl von Bitterstoffen bekannt, so z.B. Clerodin (126,127), Columbin (70), Cascarillin (90) und Pikropolin (72) oder Marrubiin (51) und Sciadin (128). Verantwortlich für den bitteren Geschmack in dieser Stoffgruppe soll nach COCKER (129) ein hoher Oxidationsgrad der Verbindungen oder Lactongruppierungen sein. In vielen Fällen besitzen solche Verbindungen auch ein furanoides System.

Bacchotricuneatin A mit D verfügen über keinen oder nur einen schwach bitteren Geschmack. Organoleptische Proben mit den in präparativer DC angereicherten übrigen Ehrlich-positiven Substanzen zeigten, daß einige davon einen stark ausgeprägten bitteren Geschmack aufweisen. Die Wirksamkeit der Droge als Stomachikum ist daher mit aller Wahrscheinlichkeit auf die Bitterwirkung der noch nicht identifizierten Clerodanbitterstoffe zurückzuführen.

Da eine Reihe von Grippemitteln Flavonoide enthalten, sind in den letzten Jahren Untersuchungen über die antivirale Wirkung dieser Stoffklasse durchgeführt worden (130,131, 132). Nach neuesten Ergebnissen von WACKER und EILMES wird z.B. durch Hesperidin die Virusvermehrung durch eine rever-

sible Beeinflussung der Zelle gehemmt (133). Neben diesen Überlegungen besteht auf der anderen Seite die Möglichkeit, daß in der Droge auch noch andere Stoffe enthalten sind, die z.B. über die Stimulierung des Immunsystems antivirale Wirkungen entfalten könnten.

In einer Übersicht über die biologischen Eigenschaften der Flavonverbindungen berichtet BÖHM (134) auch über die antibakteriellen Effekte einer Anzahl dieser Substanzen. Eine ähnliche Wirksamkeit ist von Kaffeesäure (135-138) und einigen Cumarinderivaten bekannt (139,140).

Da in Baccharis tric. eine große Zahl von Verbindungen dieser Stoffgruppen nachzuweisen war, ist denkbar, daß diese an einer therapeutischen Wirkung von Baccharis-Auszügen bei Erkältungskrankheiten und bakteriell bedingten Dermatosen beteiligt sind.

5.0 Zusammenfassung

a) Auf Grund ihrer vielseitigen Verwendung in der Volksmedizin wurde die kolumbianische Asteracee Baccharis tricuneata (Lf.) Pers. var. tricuneata einer chemischen und pharmakologischen Untersuchung unterzogen.

b) Eine Analyse der Inhaltsstoffe führte zur Isolierung von vier, bisher noch nicht bekannten Furan-Diterpenlactonen der Clerodanreihe. Ihre Strukturaufklärung erfolgte vorwiegend durch Einsatz spektroskopischer Methoden, namentlich der Protonen- und Kohlenstoff-13-Kernresonanz (141, 142).

Bacchotricuneatin A, B und C erwiesen sich als miteinander isomere Diterpen-Lactone, die sich strukturell deutlich voneinander unterschieden. Ihre Zugehörigkeit zum Clerodangerüst konnte mit Hilfe ausgedehnter ^{1}H-NMR-Doppelresonanzexperimente und durch Analogien mit bereits bekannten Verbindungen derselben Stoffklasse geklärt werden.

Die Konstitution von A als ent,trans-15,16-oxido-3,13(16),14-clerodatrien-17,12(R):18,19-dilacton und von B als ent,trans-15,16-oxido-3,13(16),14-clerodatrien-20,12(R):18,19-dilacton wurde endgültig durch eine Röntgenstrukturanalyse gesichert.

Die Struktur von Bacchotricuneatin C wurde als ent,trans-15,16-17α,20β-17β,12β-trioxido-3,13(16),14-clerodatrien-18,19-lacton aus den Protonenresonanz-Entkopplungsexperimenten abgeleitet.

Die Konstitution von Bacchotricuneatin D wurde spektroskopisch und durch entsprechende Derivatisierung als ein ent,trans-7α,19-Dihydroxy-15,16-oxido-3,13(16),14-clerodatrien ermittelt.

Die absolute Konfiguration der Diterpene A, B und C ergab sich durch Korrelation ihrer Cottoneffekte mit denen bereits bekannter verwandter Verbindungen, während sich die Stereochemie von D, das zu diesem Zweck zum Keton oxidiert wurde, durch Anwendung der CD-Oktantenregel ermitteln ließ.

Die isolierten Furanditerpenlactone zeigten gut interpretierbare biosynthetische Zusammenhänge.

c) Aus der Reihe der phenolischen Inhaltsstoffe konnten die relativ selten vorkommenden Flavone Cirsiliol und Cirsimaritin und das Cumarin Scopoletin isoliert und aufgeklärt, sein Glucosid Scopolin sowie Chlorogen- und Kaffeesäure chromatographisch identifiziert werden.

d) In pharmakologischen Untersuchungen zeigten äthanolische Zubereitungen eine schwache Tumor- und Virus-Hemmwirkung. Damit ergibt sich eine gewisse wissenschaftliche Bestätigung für die volksmedizinische Anwendung der Droge. Die isolierten Inhaltsstoffe dürften aber nicht voll für die beschriebenen Wirkungen verantwortlich sein.

E X P E R I M E N T E L L E R T E I L

6.0 Herkunft der Droge

Die Droge wurde in der Umgebung von Bogota, Kolumbien, während der Blütezeit gesammelt und durch die Fa.Friedrich G. Celo, Zweibrücken, in den Jahren 1974 - 1977 bezogen (Muster hinterlegt in der Drogensammlung des Instituts für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Ludwig-Maximilians-Universität München).

Zur Bearbeitung kamen die oberirdischen Teile der Pflanze. Extrakte der einzelnen Chargen zeigten keine auffälligen chromatographischen Unterschiede.

Wir danken Herrn F.G. Celo für die Bemühungen bei der Beschaffung der Droge und den Vermittlungen mit einheimischen Drogenkundigen.

Herrn Professor Dr. J. Grau, Institut für Systematische Botanik der Universität München, danken wir sehr herzlich für die genaue systematische Bestimmung des Pflanzenmaterials.

7.0 Allgemeine Arbeitsmethoden

7.1 Dünnschichtchromatographie

7.11 Adsorbens

Kieselgel-60F-254-Fertigplatten der Fa.Merck, Schichtdicke 0.25 mm.
Mikropolyamid F 1700 Fertigfolien der Fa.Schleicher und Schüll, Plastik, Schichtdicke 0.15 mm.

7.12 Laufmittelsysteme

Diterpene
Chloroform-Äthanol (95:5), (9:1), (98:2)
Dichlormethan-Äthanol (95:5)
Dichlormethan-Äthylacetat (95:5), (9:1), (8:2), (1:1)
n-Hexan-Äthylacetat (1:1), (4:6), (3:7), (2:8)
Benzol-Äthanol (9:1)

Alkaloidscreening
Chloroform-Äthanol (95:5),(9:1)
Benzol-Äthylacetat (1:1)
Chloroform-Äthylacetat (6:4)
Chloroform-Aceton-Methanol-Triäthylamin (3:4:1:2)

Saponinscreening
n-Butanol-Methanol-Ammoniak 25% (10:2:5)
n-Butanol-Äthylacetat-Wasser (4:1:5),(Oberphase)

Phenolische Inhaltsstoffe
auf Kieselgel:
Äthylacetat-Methanol-Wasser (100:16.5:13.5),(Bittner)
Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (10:2:3)
Benzol-Aceton (7:3)
Chloroform-Methanol (9:1)

auf Polyamid:
Chloroform-Äthylmethylketon-Methanol (60:26:14)
Methanol

Zucker
n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:2)
Pyridin-Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser (36:36:7:21)

7.13 Detektionsmittel

Nach dem Trocknen wurden die Dünnschichtplatten unter dem UV-Licht bei der Wellenlänge 255 und 360 nm betrachtet und mit einem der folgenden Reagenzien besprüht.

Alle Sprühreagenzien wurden, falls nicht anders angegeben, nach STAHL (143) angefertigt und verwendet.

Terpene und Sterine
KOMAROWSKYs Reagens (144): 50%ige Schwefelsäure und 2%ige 4-Hydroxybenzaldehydlösung in Methanol werden 1:10 vor Gebrauch gemischt.

LIEBERMANN-BURCHARD-Reagens (145) (Essigsäureanhydrid-Schwefelsäure)
Vanillin-Schwefelsäure (modifiziert):
3 g Vanillin werden in 3 ml konz.Schwefelsäure gelöst und mit Äthanol auf 100 ml aufgefüllt.
Hydroxylamin-Eisen-III-chlorid Reagens (41)

Cumarine
Bedampfen mit konz.Ammoniak (42)
BENEDIKTs Reagens (146)

Flavone
Bleiacetatlösung, 2%ig
Eisen-III-chloridlösung, 2%ig, methan.
Naturstoffreagens nach NEU (43)

Saponine
LIEBERMANN-BURCHARDs-Reagens
KOMAROWSKYs Reagens
Blutaufschwemmung (147): 2 ml Citratblut (100 ml 3.65%ige Na-citrat-Lsg. und 1000 ml Blut) und 30 ml Phosphatpufferlösung (0.9% NaCl) werden vor dem Sprühen gemischt und möglichst waagerecht aufgesprüht.
Blutgelatine (147): 4.5 g Gelatinepulver in 100 ml 0.9% NaCl-Lsg. 30 Min. quellen, erwärmen auf 80°C, abkühlen auf 40°C und mit 20 ml Citratblut mischen.

Zucker
Anilinphthalat-Lösung (148)
Diphenylamin-Phosphorsäure (147)

Alkaloide
DRAGENDORFFs Reagens nach MUNIER und MACHEBOEUFF (149)
Kaliumjodoplatinat Reagens (150)

Diterpene
EHRLICHs Reagens (50): 1 g 4-Dimethylaminobenzaldehyd wird

in einer Mischung aus 25 ml Salzsäure 36%ig und 75 ml Methanol gelöst.
KEDDEs Reagens (49): 1 g 3,5-Dinitrobenzoesäure wird in einer Mischung von 50 ml Methanol und 50 ml 2n-KOH gelöst.
DRAGENDORFFs Reagens nach MUNIER und MACHEBOEUFF
Schwefelsäure, 50%ig in Methanol gelöst: Die Platten werden anschließend auf 100°C erwärmt.

7.2 Präparative Dünnschichtchromatographie

7.21 Adsorbens

Kieselgel Fertigplatten 60 F-254 der Fa.Merck, 20 x 20 cm, Schichtdicke 0.5 und 2 mm.

Kieselgelplatten, selbst bereitet
20 g Kieselgel HF_{254} der Fa.Merck wurden mit 50 ml Wasser angerührt und auf 2 Glasplatten 20 x 20 cm ausgestrichen. Vor Gebrauch wurden die Platten ca. 80 Min. bei 120°C aktiviert.

7.22 Bearbeitungstechnik

Die in möglichst wenig Lösungsmittel gelöste Substanz wurde strichförmig mit der Blutzuckerpipette aufgetragen (ca. 10 - 50 mg/Platte) und in den angegebenen Fließmittelsystemen 1- bis 3-mal entwickelt. Nach dem Abdunsten des Lösungsmittels wurden die entsprechenden Zonen im UV-Licht oder durch Besprühen der Randzonen markiert, ausgekratzt, in eine kleine Säule gefüllt und mit ca. 100 ml Chloroform p.A. eluiert. Darauf wurde das Chloroform unter Vakuum entfernt und im jeweiligen Lösungsmittel zum Kristallisieren aufgestellt.

7.23 Laufmittelsysteme

siehe oben.

7.3 Säulenchromatographie

7.31 Sorptionsmittel

Kieselgel Merck 60, 0.2 - 0.5 mm und 0.05 - 0.2 mm.

Es wurde mit dem jeweiligen Elutionsmittel in die Säule eingeschlämmt. Ebenso wurde die aufzutragende Substanz in möglichst wenig Elutionsmittel gelöst. Die Tropfgeschwindigkeit betrug 10 - 50 Tropfen/Min., je nach Säulendurchmesser. Grobtrennungen wurden im Verhältnis 1:20, Feintrennungen im Verhältnis 1:100 g Substanz : g Kieselgel durchgeführt.

Aluminiumoxyd W 200 neutral der Fa.Woelm, Aktivitätsstufe II.

Die Säulen wurden mit dem jeweiligen Elutionsmittel gefüllt und das trockene Al_2O_3 portionsweise eingestreut, wobei durch langsames Absetzen des Adsorbens eine gleichmäßige Säulenpackung erreicht wurde.

8.0 Physikalisch-chemische Untersuchungen

Schmelzpunkte

Die Substanzen wurden über Diphosphorpentoxid in der Trockenpistole getrocknet und das Schmelzintervall auf der Kofler-Heizbank der Fa.Reichert, Wien, bestimmt. Die angegebenen Werte sind unkorrigiert.

Elementaranalyse

Die Mikro-CHN-Verbrennungsanalysen erfolgten im CHN-Analysator 185 der Fa.Hewlett-Packard bei einer Einwaage von 0.6 - 0.8 mg.

Optische Drehung

Die Drehungen wurden am lichtelektrischen Polarimeter der Fa.Zeiss LEP A2 gemessen.

UV-Spektren

Die UV-Spektren wurden mit dem Spektrophotometer DK-2A der Fa.Beckman aufgenommen, mit Einwaagen von ca. 0.5 mg/50 ml MeOH p.A.

IR-Spektren

Die IR-Spektren wurden mit dem IR-Spektrophotometer IR-8 der Fa.Beckman aufgenommen. Die Substanzen wurden als 1%ige KBr-Preßlinge präpariert oder als Film zwischen KBr-Plättchen aufgetragen.

Massenspektren

Die Massenspektren wurden am AEI MS-30 im Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, die hochauflösenden Massenspektren am Massenspektrometer AEI MS-902 des Chemistry Department, Florida State University, aufgenommen.

^{1}H-NMR-Spektren

Die Aufnahmen der Kernresonanzspektren erfolgten an unserem Institut mit einem Varian A-60, am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, mit einem HA-100 Kernresonanzspektrophotometer und am Chemistry Department, Florida State University, mit einem Bruker HFX-90 und HX-270-Gerät.

^{13}C-NMR-Spektren

Die ^{13}C-NMR-Spektren wurden an der Ungarischen Akademie der Wissenschaften auf einem Varian XL-100-Gerät bei 25.2 MHz und am Chemistry Department der Florida State University am Bruker HX-270 Kernresonanzspektrophotometer bei 67.9 MHz aufgenommen.

Circulardichrogramme

Die CD-Kurven wurden mit einem Circulardichrographen am Institut für Strukturchemie der Ruhr-Universität Bochum und mit dem Spektropolarimeter JASCO J-15 des Chemistry Department der FSU gemessen. Als Lösungsmittel dienten Acetonitril oder Methanol p.A.

Röntgenstrukturanalyse

Die Röntgenstrukturanalyse wurde in einem automatischen Einkristalldiffraktometer der Fa.Siemens durchgeführt. Die Be-

rechnungen zur Strukturanalyse erfolgten an der Siemens-Rechenanlage 4004/150 am Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried.

Für die Ausführung und Aufnahme der Elementaranalysen, optischen Drehungen, UV-, IR-, H-NMR- und Massenspektren danke ich Herrn Dr.O.Seligmann und seinen Mitarbeiterinnen am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München.

Herrn Dr.J.Sonnenbichler, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried, und Herrn Dr.A.Neszmelyi, Ungarische Akademie der Wissenschaften, Budapest, danke ich für die Aufnahme einiger ^{1}H-NMR- bzw. ^{13}C-NMR-Spektren sowie für die Unterstützung bei ihrer Interpretation.

Für die Aufnahme und Diskussion der CD-Spektren von Bacchotricuneatin A und B danke ich Herrn Professor Dr. G.Snatzke, Ruhr-Universität Bochum.

Mein besonderer Dank gilt auch Herrn Dr.H.Lotter, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, der die Röntgenstrukturanalyse von Bacchotricuneatin A und B durchführte.

9.0 Spezielle Arbeitsmethoden

9.1 Orientierende Voruntersuchungen

9.11 allgemein chromatographisch

Je 100 g trockene Pulverdroge wurden am Soxhlet 5 Stdn. lang mit Benzol, Äther und Methanol extrahiert.
Die eingeengten Extrakte wurden anschließend dünnschichtchromatographisch nach 7.12 untersucht.

9.12 Hydrolyse des flavonhaltigen Methanolextraktes

Die Hälfte des Methanolextraktes wurde zur Chlorophyllabtrennung nach dem Eindampfen zur Trockne in heißem Wasser aufgenommen, mehrmals digeriert, abgekühlt und filtriert.

3 g des Chlorophyll-freien, hellbraunen Extraktes wurden in 80 ml MeOH 50% gelöst und mit 60 ml 2n-HCl am Rückfluß 2 Stdn. hydrolisiert. Anschließend wurde das Hydrolysat mit 10 g Ag_2O 3 Stdn. am Magnetrührer gerührt, dann abfiltriert und im Vakuum eingeengt. Das neutralisierte Hydrolysat wurde nach 7.12 dünnschichtchromatographisch untersucht.

9.13 Untersuchung auf Saponine

Extraktion nach TSCHESCHE (44):

10 g gepulverte Droge wurden 2 Stdn. mit 80%igem Methanol am Rückfluß erhitzt. Der eine Nacht gekühlte und dann filtrierte, grünbraune Extrakt wurde im Vakuum auf ein Drittel eingeengt und mit Chloroform anschließend ausgeschüttelt. Man erhielt eine hellgelbe Chloroformphase, die keine Neigung zu Schaum- oder Emulsionsbildung zeigte. Die wässrig-methanolische Phase wurde einrotiert, bis kein Methanol mehr zu riechen war und darauf mit n-Butanol ausgeschüttelt. Beim Einengen der hellgelben n-Butanolfraktion bildete sich reichlich hellgelber Niederschlag, der beim Lösen in 50%igem Methanol keine Schaumbildung zeigte.
Chloroform-, n-Butanol- und Wasserphase wurden dünnschichtchromatographisch nach 7.12 untersucht.

Acetonfällung nach HILLER und KEIPERT (45):

10 g gepulverte Droge wurden mit 50 ml Methanol 1/2 Stde. am Rückfluß gekocht, anschließend mit 10 ml Wasser versetzt und eine weitere halbe Stunde gekocht. Der dann vorsichtig eingeengte und geklärte Extrakt wurde portionsweise in Aceton getropft. Es bildete sich ein gelblich-weißer Niederschlag, der nach dem Abzentrifugieren in 40%igem Methanol gelöst wurde und nach 7.12 chromatographiert wurde.

9.14 Alkaloidscreening (46)

a) Extraktion der unbehandelten Droge:
100 g Drogenpulver wurden aufeinanderfolgend je 5 Stdn. am Soxhlet mit n-Hexan, Äther und Methanol extrahiert. Vor dem Wechsel des Extraktionsmittels wurde die Droge immer an Luft getrocknet.

b) Extraktion nach Alkalibehandlung:
100 g Drogenpulver wurden mit ca. 12%iger, d.h. gesättigter Natriumcarbonatlösung gerade so stark angefeuchtet und durchgeknetet, daß ein leicht rieselndes Granulat entstand. Nach dem Trocknen über Nacht wurde das so vorbehandelte Drogenpulver wie unter 9.14 a) weiterbehandelt.
Die so erhaltenen Extrakte wurden dünnschichtchromatographisch nach 7.12 verglichen.

Salzsaure Auszüge:
Alle eingeengten Extrakte wurden einzeln 2mal mit je 20 ml 1n-, dann einmal mit 2n Salzsäure an der Schüttelmaschine 30 Min. extrahiert. Proben der salzsauren Auszüge wurden zum Nachweis von Alkaloiden mit MAYERs bzw. VALSERs Reagens versetzt.

VALSERs Reagens auf Alkaloidsalze (151)
10 g Kaliumjodid werden in 100 ml Wasser gelöst und mit 15 g Quecksilber-II-jodid versetzt. Die Mischung wird solange gerührt, bis fast das ganze Quecksilberjodid gelöst ist, und dann filtriert.
Probe: Zu etwa 1 - 2 ml der sauren, wässrigen, alkaloidhaltigen Lösung werden 1 - 3 Tropfen VALSERs Reagens ge-

geben. Die Reaktion ist dann positiv, wenn eine Trübung oder ein weißer Niederschlag auftritt.

MAYERs Reagens (152)
1.35 g Quecksilber-II-chlorid werden in 60 ml Wasser gelöst und in eine Lösung aus 5 g Kaliumjodid in 10 ml Wasser gerührt. Die Lösung wird auf 100 ml mit Wasser verdünnt.
Probe: analog VALSER

Während die salzsauren Auszüge der Hexanfraktionen der unbehandelten und alkalisierten Droge nur opalisierende Trübungen mit MAYERs und VALSERs Reagens zeigten, ergaben die der Äther- und Methanolfraktionen reichliche, hellgelb gefärbte Niederschläge.
Zur Anreicherung und Reinigung eventueller Alkaloide wurden die salzsauren Auszüge stufenweise mit Natriumcarbonat neutralisiert bzw. alkalisiert und jeweils bei pH 7 und pH 9 - 10 mit Chloroform ausgeschüttelt.
Alle organischen Ausschüttelfraktionen wurden mit DC nach 7.12 untersucht und verglichen.
Nach der Rückverteilung der eingeengten Chloroformphasen der Äther- und Methanolfraktionen gegen 2n HCl blieben die Proben nach MAYER und VALSER negativ oder zeigten nur opalisierende Trübungen.

10.0 Isolierungen

10.1 Isolierung von Bacchotricuneatin A und B aus alkalisierter Droge

3 kg der pulverisierten Droge wurden durch einwöchige Mazeration mit 9 l Petroläther entfettet, das trockene Drogenpulver anschließend mit 500 ml gesättigter Na_2CO_3-Lösung durchfeuchtet und nach 10stündigem Trocknen im Soxhlet mit 12 l n-Hexan ca. 72 Stdn. extrahiert. der erhaltene grünbraune Extrakt wurde auf 5 l eingeengt und 8 Tage bei $0^{\circ}C$ gelagert. Es bildete sich ein gelber Niederschlag (14 g), der die beiden Verbindungen angereichert enthielt und deshalb weiter verarbeitet

wurde. Der überstehende Extrakt wurde vernachlässigt.

Die Bearbeitung des Rohgemisches erfolgte in mehrfacher Säulenchromatographie.

Grobtrennung
Adsorbens: 800 g Kieselgel 0.2 - 0.5 mm Merck
Elutionsmittel: Chloroform-Äthanol (95:5)
Aufgetragene Menge: 14 g
Säulenhöhe: 52 cm Säulendurchmesser: 9 cm
Tropfgeschwindigkeit: 30 Tr./Min.
Fraktionen a 15 ml
Die Fraktionierung wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt; Detektion: Dragendorffs Reagens.

Feintrennung der A und B-haltigen Fraktionen 29 - 86 (1.14 g)
Adsorbens: 150 g Kieselgel Merck 60 0.05 - 0.2 mm
Elutionsmittel: n-Hexan-Äthylacetat (7:3)
Aufgetragene Menge: 1.14 g
Säulenhöhe: 37 cm Säulendurchmesser: 3.3 cm
Tropfgeschwindigkeit: 18 Tr./Min.
Fraktionen a 7 ml
Aus den Fraktionen 29 - 34 erhielt man 46.5 mg B, die Fraktionen 52 - 103 lieferten 84 mg A, Fraktionen 35 - 51 ergaben 106 mg eines A/B-Gemisches.
Die Trennung der Mischfraktionen und weitere Reinigung erfolgte durch mehrmalige präparative DC in Chloroform-Äthanol (98:2), 3mal entwickelt.

R_f: A = 0.50 B = 0.66
Kristallisation: A aus Dichlormethan-Äthanol (1:4)
B aus Dichlormethan-n-Hexan (1:5)
Ausbeuten: A 97 mg B 73 mg

10.2 Isolierung von Bacchotricuneatin A, B, C und D

3 kg pulverisierte Droge wurden ohne Vorbehandlung im Soxhlet erschöpfend mit 12 l n-Hexan extrahiert (75 Stdn.). Nach dem Einengen des Extraktes im Vakuum erhielt man 32 g eines aro-

matisch riechenden, braungrünen Rückstandes, der in 2 Portionen von 16 g säulenchromatographisch weiterverarbeitet wurde.

Vorfraktionierung
Adsorbens: 1.2 kg Kieselgel 0.2 - 0.5 Merck
Elutionsmittel: n-Hexan-Äthylacetat (4:6)
Aufgetragene Menge: 16 g
Säulenhöhe: 67 cm Säulendurchmesser: 11 cm
Tropfgeschwindigkeit: 30 - 40 Tr./Min.
Fraktionen a 60 ml
Die Fraktionierung wurde auf DC verfolgt; Detektionsmittel: EHRLICHs und DRAGENDORFFs Reagens.

Zusammengehörige Fraktionen wurden zu 4 Hauptfraktionen vereint, die dann getrennt auf KG-Säulen weiterverarbeitet wurden.

Fraktionen 15 - 21 →	Hauptfraktion I:	B-haltig	1.19 g
Fraktionen 28 - 33 →	Hauptfraktion II:	A-haltig	1.23 g
Fraktionen 34 - 49 →	Hauptfraktion III:	A/C-haltig	0.90 g
Fraktionen 70 - 93 →	Hauptfraktion IV:	D-haltig	1.42 g

SC von Hauptfraktion I (Substanz B)
Adsorbens: 150 g Kieselgel 60 Merck 0.05 - 0.2 mm
Elutionsmittel: Dichlormethan-Äthylacetat (9:1)
Aufgetragene Menge: 1.2 g
Säulenhöhe: 45 cm Säulendurchmesser: 2.7 cm
Tropfgeschwindigkeit: 18 Tr./Min.
Fraktionen a 12 ml

Fraktionen 33 - 51 enthielten 336 mg B als Rohprodukt.

SC von Hauptfraktion II (Substanz A)
Adsorbens: 150 g Kieselgel 60 Merck 0.05 - 0.2 mm
Elutionsmittel: Dichlormethan-Äthylacetat (9:1)
Aufgetragene Menge: 1.23 g
Säulenhöhe: 44 cm Säulendurchmesser: 2.7 cm

Tropfgeschwindigkeit: 18 Tr./Min.
Fraktionen a 12 ml

Fraktionen 57 - 68 enthielten 289 mg A als Rohprodukt.

SC von Hauptfraktion III (Substanzen A und C)
Adsorbens: 130 g Kieselgel 60 Merck 0.05 - 0.2 mm
Elutionsmittel: Dichlormethan-Äthylacetat (9:1)
Aufgetragene Menge: 0.9 g
Säulenhöhe: 53 cm Säulendurchmesser: 1.5 cm
Tropfgeschwindigkeit: 15 Tr./Min.
Fraktionen a 7 ml

Fraktionen 93 - 108 enthielten 47 mg Substanz A
Fraktionen 113 - 121 enthielten 14 mg Substanz C

SC von Hauptfraktion IV (Substanz D)
Adsorbens: 170 g Kieselgel 60 Merck 0.05 - 0.2 mm
Elutionsmittel: Dichlormethan-Äthylacetat (1:1)
Aufgetragene Menge: 1.4 g
Säulenhöhe: 54 cm Säulendurchmesser: 2.7 cm
Tropfgeschwindigkeit: 20 Tr./Min.
Fraktionen a 12 ml

Fraktionen 42 - 61 enthielten 212 mg D als Rohprodukt.

Präparative DC der Verbindungen A - D
Durchführung wie unter 7.2 angegeben.

Laufmittel zur Reinigung von

Substanz A:
Chloroform-Äthanol (19:1), 2mal entwickelt R_f = 0.77

Substanz B:
Dichlormethan-Äthylacetat (44:1) 2mal entwickelt R_f = 0.22
Chloroform-Äthanol (95:5) R_f = 0.82

Substanz C:
Chloroform-Äthanol (24:1) R_f = 0.67
Dichlormethan-Äthylacetat (9:1) R_f = 0.41

Substanz D:
Chloroform-Äthanol (19:1), 2mal entwickelt R_f = 0.38

Kristallisation und Ausbeuten der Verbindungen A mit D

A : aus Dichlormethan-Äthanol	(1:4)	270 mg
B : aus Dichlormethan-n-Hexan	(1:5)	160 mg
C : aus Dichlormethan-Äthanol	(1:2)	4 mg
D : aus Äthylacetat-n-Hexan	(1:1)	105 mg

10.3 Isolierung der Flavone F_1 und F_2

Nach der Hexanextraktion wurde der Drogenrückstand getrocknet und anschließend 48 Stdn. im Soxhlet mit Äther extrahiert. Nach mehrwöchiger Lagerung des zur Hälfte eingeengten Extraktes bei 0°C schied sich ein gelber, mit Flavonen angereicherter Niederschlag (6 g) aus, der über Kieselgelsäulen aufgetrennt wurde.

Säulenchromatographie (F_1 und F_2)
Adsorbens: 150 g Kieselgel 60 Merck 0.2 - 0.5 mm
Elutionsmittel: Fraktion I Petroläther
Fraktion II Benzol
Fraktion III Chloroform
Fraktion IV Methanol-Chloroform (1:9)
Fraktion V Methanol-Chloroform (1:4)
Fraktion VI Methanol-Chloroform (1:1)
Aufgetragene Menge: 2.5 g
Säulenhöhe: 45 cm Säulendurchmesser: 2.7 cm
Tropfgeschwindigkeit: 20 Tr./Min.

Fraktionen V und VI enthielten eine Mischung der Flavone F_1 und F_2 und wurden mit präparativer DC weitergetrennt.

Präparative DC von F_1 und F_2
Laufmittel:
Benzol-Essigsäure-Wasser (125:72:3)
Chloroform-Methanol (9:1)

F_1 kristallisierte aus Methanol: 45 mg

F_2 kristallisierte aus Äthanol : 18 mg

10.4 Isolierung des Cumarins S_1

Der überstehende Ätherextrakt wurde eingeengt (9.5 g) und gegen Chloroform/Wasser verteilt. Nach 6maligem Ausschütteln reicherte sich das Hauptcumarin quantitativ in der Chloroformphase an. Sie wurde im Vakuum eingeengt (1.5 g) und an Kieselgel chromatographiert.

Säulenchromatographie (S_1)
Adsorbens: 80 g Kieselgel 60 Merck 0.05 - 0.2 mm
Elutionsmittel: Benzol-Aceton (7:3)
Aufgetragene Menge: 500 mg
Säulenhöhe: 32 cm Säulendurchmesser: 1.3 cm
Tropfgeschwindigkeit: 15 Tr./Min.
Fraktionen a 10 ml

Die Fraktionen 31 - 44 enthielten 83 mg S_1, das aus Chloroform umkristallisiert wurde. Ausbeute: 56 mg.

11.0 Strukturaufklärungen

11.1 Bacchotricuneatin A (1)

Smp.: 241 - 242°C grünliche Prismen (CH_2Cl_2-EtOH 1:4)
DC: (Kieselgel) Chloroform-Äthanol (95:5) R_f = 0.69
Dichlormethan-Äthylacetat (9:1) R_f = 0.31
n-Hexan-Äthylacetat (4:6) R_f = 0.60
Detektion: Löschung bei 254 nm
Ehrlichs Reagens rosa
Dragendorffs-Reagens orange

$[\alpha]_D^{25} = -121.3^\circ$ (c = 0.936 in $CHCl_3$)

$C_{20}H_{22}O_5$ (Mol.Gew. 342.1) gef.: C 70.20% H 5.04%
ber.: C 70.17% H 6.45%
Mol.Gew. durch hochaufl. MS: gef.: 342.1468
ber.: 342.1466

UV (MeOH): siehe Abb. 9, S. 23

λ_{max} = 210 (ε = 12094, Endabsorption) 239 (ε = 2351) nm

IR (KBr): siehe Abb. 8, S. 22

cm^{-1}: 3150, 1500, 870 (Furan); 1750 (α,β-ungesätt.γ-Lacton); 1725 (δ -Lacton); 1645 (Doppelbindung)

CD (Acetonitril, c = 0.4483 mg/ml) vgl. Abb. 38, S. 66

$[\Theta]_{282} = 0$; $[\Theta]_{241} = -26992$; $[\Theta]_{216} = -6596$; $[\Theta]_{195} = -31987$; $[\Theta]_{190} = -31284$;

hochauflösendes MS:

m/e (Zusammensetzung, rel.Int. in %) M^+ 342 ($C_{20}H_{22}O_5$; 18.8) 312 ($C_{19}H_{20}O_3$; 100); 247 ($C_{14}H_{15}O_5$,3); 231 ($C_{14}H_{15}O_3$; 5); 189 ($C_{12}H_{13}O_2$; 21); 149 ($C_8H_5O_3$; 18); 145 ($C_{11}H_{13}$;41); 131 ($C_{10}H_{11}$; 27); 95 (C_6H_7O; 98); 95 ($C_5H_3O_2$; 20.8); 94 (C_6H_6O; 90); 81 (C_5H_5O; 20);

^{1}H-NMR (in $CDCl_3$, 90 MHz, TMS int.):
δ (ppm): 0.85 (s,3H) tert. CH_3; 3.94 (1H dd J = 8/2 Hz) H-18a, 4.28 (1H d J = 8 Hz) H-18b; 5.39 (1H dd J = 11/8 Hz) H-12; 6.42 (1H brs) H-14; 6.73 (1H dd J = 7/3 Hz) H-3; 7.45 (2H m) H-15,16; 1.0 -2.64 (12 H)

^{1}H-NMR (in $CDCl_3$, 270 MHz, TMS int.)

Spektraldaten siehe Tab. 4, S. 34 und Abb. 10, S. 24

^{13}C-NMR (in $CDCl_3$+ DMSO, 25.2 MHz, TMS int.)
siehe Abb.14, S.32 und Tab.6, S. 43

δ (ppm): 173.1; 168.3 (Carboxylgruppen); 143.7; 139.7; 137.9; 135.8; 125.0; 108.7 (aromatisch-olefinischer Bereich); 7.10; 69.9 (alkoholisch gebundenes C); 53.7; 47.4; 45.0; 43.4; 36.9; 32.8; 27.6; 20.0; 19.6; 19.4 (aliphatisch bzw. cycloaliphatischer Bereich);

11.11 Lactontitration

3.02 mg Bacchotricuneatin A wurden in 2 ml EtOH gelöst und mit 3 ml 0.01n NaOH 30 Min. im Wasserbad verseift. Die Lösung wurde heiß mit 0.01n HCl titriert. Unter gleichen Bedingungen wurde ein Blindversuch durchgeführt.

Verbrauch für Lactonspaltung: 0.98 ml 0.01n NaOH
307 mg VÄ d.h. 1.1 Mol Alkali

Die neutrale Lösung wurde im Vakuum zur Trockene eingeengt, der Rückstand mehrmals mit CH_2Cl_2 digeriert und filtriert. Das so erhaltene Gemisch von Bacchotricuneatin A und Hydroxycarbonsäure (1a) wurde in präp. DC getrennt.

LM: Chloroform-Methanol (95:5) R_f = 0.39

Hydroxycarbonsäure (1a): 1.9 mg
MS: M^+ 360 (14%)
m/e (%): 342(23), 312(100), 95(55), 94(78)

Nach dem Ansäuern der isolierten Hydroxycarbonsäure war im DC wieder Bacchotricuneatin A nachzuweisen.

11.12 Katalytische Hydrierung von A

31 mg A, gelöst in 30 ml Äthylacetat, wurden mit 15 mg Pd/C 10% 16 Stdn. bei 2 atü unter Schütteln hydriert. Anschliessend wurde filtriert und unter Vakuum eingeengt.

Ausbeute: 30.5 mg

DC: $CHCl_3$-EtOH (95:5) Hexahydroderivat (1b) R_f = 0.72
Octohydrocarbonsäure (1c) R_f = 0.37

Detektion mit Schwefelsäure 50%, keine Löschung, Dragendorff- und Ehrlichs-Reaktion.

Das trockene Gemisch wurde in 20 ml $CHCl_3$ aufgenommen und 5mal gegen 5 ml 10%iger Na_2CO_3-Lsg. ausgeschüttelt.

Die $CHCl_3$-Phase wurde nach dem Einengen in präp.DC weitergereinigt (LM: $CHCl_3$-EtOH 95:5, Ausbeute 7.3 mg) und das Hexahydroderivat aus Dichlormethan umkristallisiert.

Hexahydroderivat (1b): Smp.: 197 - 201°C 3.9 mg

$C_{20}H_{28}O_5$ 348 Mol.Gew.

MS:
m/e 348 (M^+), 330, 319, 305, 251, 233, 205, 193, 161, 147

IR (KBr):
cm^{-1}: 2940, 1770 (ges.γ-Lacton), 1730 (δ-Lacton), keine Furan- und Doppelbindungsbanden.

Die vereinigten Na_2CO_3-Phasen wurden mit 1n-HCl vorsichtig neutralisiert und die wässrige Lösung gegen Chloroform ausgeschüttelt. Nach dem Waschen der Chloroform-Phase und Einengen im Vakuum verblieb ein Rd. von 4.6 mg. Umkristallisiert aus Dichlormethan-Methanol.

Octohydrocarbonsäure (1c): Smp.: 116 - 119°C 2.1 mg

$C_{20}H_{30}O_5$ 350 Mol.Gew.

MS:
m/e 350 (M^+), 332, 320, 318, 267, 251, 233, 193, 161, 147

IR (KBr):
cm^{-1}: 2950-2850 (OH), 1765 (ges.γ-Lacton), 1700 (Säurecarbonyl), keine Furan- und Doppelbindungsbanden.

11.13 Röntgenstrukturanalyse von A

Zellkonstanten: (Weissenberg- und Precessionskamera)

$a = 12.45_4$ Å

$b = 11.04_3$ Å

$c = 12.34_5$ Å

Raumgruppe: orthorhombisch $P\ 2_1\ 2_1\ 2_1$ mit 4 Molekülen in der Elementarzelle

Dichte (Schwebemethode KJ/H_2O) gef.: 1.345 g/cm^3
ber.: 1.338 g/cm^3

Die Einzelkristalldaten bis $\sin \Theta/\lambda_{max} = 0.59$ $Å^{-1}$ wurden auf einem automatischen Siemens-Einkristall-Diffraktometer mit Ni-gefilterter Cu Kα-Strahlung gesammelt ($\lambda = 1.5418$ Å) 1624 unabhängige Reflexe wurden gemessen, davon 1545 beobachtet ($> 2\sigma[I]$)

Fünfpunktmessungen mit 2^o scan range wurden gelöst mit "Direkten Methoden" (Programmsystem Multan). 128 Phasensätze wurde berechnet: die beste Lösung zeigte 24 von 25 Nicht-Wasserstoffen. Das letzte Atom konnte durch Fouriersynthese ermittelt werden.

Endgültiger R-Faktor: 7.5%

T a b e l l e 12 (s.S.101)

Atom-Parameter der Nicht-Wasserstoffatome (x 10^4) von Bacchotricuneatin A

(Lage-Parameter sind als Bruchteile der Elementarzellen-Konstanten gegeben. Die anisotropen thermischen Schwingungs-Parameter entsprechen dem Ausdruck $-(h^2\beta_{11} + k^2\beta_{22} + l^2\beta_{33} + 2hk\beta_{12} + 2hl\beta_{13} + 2kl\beta_{23})$. Standardabweichungen im selben Maßstab sind in Klammern.)

	x/a	y/b	z/c	β_{11}	β_{22}	β_{33}	β_{12}	β_{13}	β_{23}
C(1)	7533(7)	96(6)	1462(7)	58(5)	48(5)	96(6)	14(4)	-14(5)	1(5)
C(2)	1757(7)	4369(7)	4357(7)	61(6)	55(6)	131(7)	-11(5)	-15(6)	15(6)
C(3)	7480(6)	1410(6)	4941(7)	66(5)	51(5)	86(7)	0(5)	-2(5)	4(6)
C(4)	8483(6)	1178(6)	4713(7)	59(5)	43(5)	77(7)	6(5)	-8(5)	-0(5)
C(5)	4072(5)	4831(5)	4925(6)	48(5)	43(5)	72(6)	-3(4)	8(5)	2(5)
C(6)	341(6)	4648(6)	1007(7)	67(5)	53(5)	88(7)	-8(5)	10(5)	-9(5)
C(7)	9694(6)	3620(6)	555(7)	58(5)	47(6)	125(7)	-12(5)	21(6)	-16(6)
C(8)	5475(6)	2166(5)	90(7)	50(5)	45(5)	87(6)	12(4)	-7(5)	-1(5)
C(9)	6133(5)	1676(5)	1149(6)	45(5)	50(5)	63(6)	1(4)	-0(5)	-7(5)
C(10)	6694(5)	657(5)	631(6)	41(4)	42(5)	74(6)	8(4)	-2(4)	-5(5)
C(11)	6977(6)	2564(6)	1533(7)	49(5)	39(5)	94(6)	1(4)	2(5)	-1(5)
C(12)	6669(6)	3692(6)	1048(6)	46(5)	43(5)	80(6)	5(4)	12(5)	-7(5)
C(13)	7172(6)	4631(6)	1716(7)	54(5)	44(5)	84(6)	-2(4)	18(5)	-0(5)
C(14)	2932(7)	752(7)	3658(8)	92(6)	53(6)	107(8)	5(6)	6(6)	2(6)
C(15)	2337(7)	1328(8)	2850(8)	100(7)	56(7)	110(9)	-2(6)	1(7)	18(7)
C(16)	7787(7)	4610(7)	2709(7)	76(6)	60(6)	76(7)	0(5)	4(6)	-12(6)
C(17)	4864(7)	3130(7)	603(7)	63(6)	47(6)	101(7)	14(5)	-17(6)	1(6)
C(18)	4962(6)	4262(7)	4123(8)	66(6)	54(6)	104(8)	21(5)	23(6)	14(6)
C(19)	9305(7)	2027(7)	4501(7)	71(6)	46(6)	109(7)	12(5)	1(6)	-0(6)
C(20)	5413(6)	1435(6)	2266(7)	76(6)	60(6)	79(7)	-6(5)	21(6)	-4(6)
O(1)	1901(5)	660(5)	2018(5)	98(5)	65(5)	94(6)	5(4)	-13(4)	22(5)
O(2)	5497(4)	3866(4)	1145(5)	52(4)	47(4)	106(5)	14(3)	-4(4)	-10(4)
O(3)	3917(5)	3246(5)	638(6)	48(5)	75(5)	188(7)	26(5)	-20(5)	-27(5)
O(4)	5184(5)	3242(5)	4814(5)	75(4)	50(4)	122(5)	13(4)	13(4)	5(4)
O(5)	9294(5)	2859(5)	3894(6)	87(5)	55(5)	167(6)	0(4)	9(5)	35(5)

11.2 Bacchotricuneatin B (2)

Smp.: 191 - 192°C (Sublimation) weiße Kristalle (CH_2Cl_2-n-Hexan 1:5)

DC: Kieselgel Chloroform-Äthanol (95:5) R_f = 0.81
Dichlormethan-Äthylacetat (9:1) R_f = 0.59
n-Hexan-Äthylacetat (4:6) R_f = 0.69

Detektion: Löschung bei 254 nm
Ehrlichs-Reagens rosa
Dragendorffs-Reagens orange

$[\alpha]_D^{25} = -93.3^\circ$ (c = 0.932 in $CHCl_3$)

$C_{20}H_{22}O_5$ (Mol.Gew. 342.14) gef.: C 70.20% H 5.98%
ber.: C 70.17% H 6.45%

Mol.Gew. durch hochauflös.MS: gef.: 342.1474
ber.: 342.1468

UV (MeOH): siehe Abb. 9, S. 23

λ_{max} = 210 (ε = 9843, Endabsorption), 240 (ε = 1686) nm

IR (KBr): siehe Abb. 16, S. 35

cm^{-1}: 3160, 1490, 878 (Furan), 1740 (dopp.Int., γ-Lacton) 1640 (Doppelbindung).

CD (Acetonitril, c = 0.3409 mg/ml) vgl. Abb. 38, S.66

$[\Theta]_{288} = 0$; $[\Theta]_{245} = -17559$; $[\Theta]_{227} = 0$; $[\Theta]_{215} = 10606$; $[\Theta]_{204} = 0$

Hochauflösendes MS:
m/e (Zusammensetzung, rel.Int. in %) M^+ 342 ($C_{20}H_{22}O_5$, 0.4) 312 ($C_{19}H_{20}O_3$; 100); 284 ($C_{18}H_{20}O_3$; 12); 267 ($C_{18}H_{19}O_2$; 9.7) 231 ($C_{14}H_{15}O_3$; 3); 218 ($C_{13}H_{14}O_3$; 12.5); 203 ($C_{12}H_{11}O_3$; 7.7) 200 ($C_{13}H_{12}O_2$; 13.7); 197 ($C_{14}H_{13}O$; 4); 190 ($C_{12}H_{14}O_2$; 18.3); 188 ($C_{12}H_{12}O_2$; 1.4); 185 ($C_{13}H_{13}O$; 9.1); 173 ($C_{12}H_{14}O$; 6.7); 172 ($C_{12}O_{12}O$; 14.8); 145 ($C_{11}H_{13}$; 17) 143 ($C_{11}H_{11}$; 10); 129 ($C_{10}H_9$; 13.1); 117 (C_9H_9; 12.2); 115 (C_9H_7; 9); 105 (C_8H_9; 13.7); 95 (C_6H_7O; 40); 94 (C_6H_6O; 32); 81 (C_5H_5O; 14); Ende der Daten

^{1}H-NMR (in $CDCl_3$, 90 MHz, TMS int.)

δ (ppm): 1.12(3H, d J = 7 Hz) H-17; 2.51 (2H d J = 8 Hz) H-11a, b; 4.0 (1H dd J = 9/2 Hz) H-18a; 4.65 (1H d J = 9 Hz) H-18b; 5.46 (1H t J = 8 Hz) H-12; 6.36 (1H brs) H-14; 6.66 (1H dd J = 7/3 Hz) H-3; 7.44 (2H m) H-15,16; 1.17 - 2.51 (10 H).

^{1}H-NMR (in $CDCl_3$, 270 MHz, TMS int.)

Spektraldaten siehe Tab. 4, S. 34 und Abb. 17, S. 36

^{13}C-NMR (in $CDCl_3$, 25.2 MHz, TMS int.)

siehe Abb. 21, S. 42 und Tab. 6, S. 43

δ (ppm): 177.0; 169.0 (Carboxylgruppen); 144.2; 139.4; 139.2; 134.2; 125.7; 107.9 (aromatisch-olefinischer Bereich); 72.9; 71.8 (alkoholisch geb. C); 50.9; 49.5; 45.4; 43.2; 42.0; 33.6; 28.0 (dopp.Int!); 21.0; 17.1 (cycloaliphatischer bzw. aliphatischer Bereich).

11.21 Röntgenstrukturanalyse von B

Zellkonstanten: (Weissenberg- und Precessionskamera)

$a = 21.59_5$ Å

$b = 6.59_4$ Å

$c = 12.01_1$ Å

Raumgruppe: orthorhombisch $P\,2_1\,2_1\,2_1$ mit 4 Molekülen in der Elementarzelle

Dichte (Schwebemethode KJ/H_2O) gef.: 1.359 g/cm^3
ber.: 1.329 g/cm^3

Einzelkristalldaten gemessen auf einem automatischen Siemens-Einkristall-Diffraktometer. 1683 unabhängige Reflexe wurden gemessen, davon 1314 beobachtet. Ein Referenzreflex, aufgenommen nach je 20 Messungen zeigte keine Intensitätsänderungen.

3 Ursprungs- und 3 Startreflexe ergaben bei Reduzierung der Anzahl der E-Werte von 400 auf 200 (85) eine E-map, aus der die Lage aller 25 Nichtwasserstoffatome entnommen werden konnte.

Endgültiger R-Faktor: 9.2%

T a b e l l e 13 (s.S.105)

Atom-Parameter der Nicht-Wasserstoffatome (x 10^4) von Bacchotricuneatin B

(Lage-Parameter sind als Bruchteile der Elementarzellen-Konstanten gegeben. Die anisotropen thermischen Schwingungs-Parameter entsprechen dem Ausdruck $-(h^2\beta_{11} + k^2\beta_{22} + l^2\beta_{33} + 2hk\beta_{12} + 2hl\beta_{13} + 2kl\beta_{23})$. Standardabweichungen im selben Maßstab sind in Klammern.)

	x/a	y/b	z/c	β_{11}	β_{22}	β_{33}	β_{12}	β_{13}	β_{23}
C(1)	2926(6)	2809(21)	4668(9)	28(3)	355(41)	52(8)	4(10)	-5(4)	6(17)
C(2)	2316(7)	3775(26)	5008(10)	41(4)	495(55)	55(9)	18(15)	-5(5)	43(20)
C(3)	2809(7)	6528(23)	1276(12)	45(5)	303(41)	94(12)	24(13)	-13(7)	-18(21)
C(4)	2335(6)	6901(19)	1932(9)	38(4)	256(36)	46(8)	7(10)	0(5)	1(15)
C(5)	1664(6)	7124(20)	1648(9)	39(4)	237(35)	47(8)	-9(10)	2(5)	3(14)
C(6)	1219(7)	5796(24)	2408(9)	40(4)	406(49)	50(8)	-43(13)	6(5)	20(17)
C(7)	553(7)	6173(24)	2069(10)	39(4)	426(47)	54(9)	-37(13)	7(5)	-15(19)
C(8)	420(7)	5523(24)	828(10)	38(4)	400(46)	51(8)	-27(12)	9(5)	-3(17)
C(9)	898(7)	6547(21)	-24(9)	36(4)	274(35)	48(8)	-1(11)	5(5)	-20(14)
C(10)	1558(6)	6358(19)	397(8)	35(3)	236(32)	34(6)	10(10)	3(4)	-9(13)
C(11)	4183(7)	4592(22)	3831(9)	45(4)	330(41)	50(8)	16(12)	-2(6)	20(16)
C(12)	4496(6)	3009(21)	3045(10)	39(4)	321(41)	62(9)	9(12)	-7(5)	-5(18)
C(13)	4117(6)	2577(22)	1982(9)	28(3)	362(41)	55(8)	2(11)	3(5)	15(17)
C(14)	3576(7)	1349(25)	1863(10)	35(4)	420(49)	66(9)	-24(13)	-4(5)	33(20)
C(15)	3404(7)	1503(25)	794(11)	40(5)	342(47)	86(12)	-10(13)	-8(6)	-28(21)
C(16)	4265(6)	3392(26)	963(10)	31(4)	464(55)	64(9)	-19(13)	-4(5)	-4(20)
C(17)	261(7)	1060(30)	4436(11)	35(4)	573(64)	74(11)	23(14)	1(5)	-2(24)
C(18)	1579(7)	9344(21)	1980(10)	42(4)	286(39)	59(9)	-6(11)	-14(5)	-7(16)
C(19)	2425(7)	8079(23)	2984(11)	39(4)	294(42)	80(11)	-18(12)	5(6)	1(20)
C(20)	4293(6)	1361(22)	4753(10)	31(4)	318(40)	62(9)	10(11)	-5(5)	11(18)
O(1)	3814(4)	2726(17)	238(6)	39(3)	443(35)	58(6)	-15(9)	-10(4)	25(14)
O(2)	4508(4)	1124(15)	3670(7)	40(3)	338(28)	64(7)	30(8)	-2(4)	-4(12)
O(3)	693(5)	115(14)	339(7)	47(3)	306(27)	77(7)	17(8)	-5(4)	-33(13)
O(4)	1985(5)	9486(14)	2980(7)	46(3)	303(27)	64(7)	-12(8)	0(4)	-34(12)
O(5)	2825(5)	7935(16)	3700(7)	46(3)	434(35)	62(7)	-26(9)	-8(4)	8(14)

11.3 Bacchotricuneatin C (3)

Smp.: 188 - 190°C farblose Plättchen (CH_2Cl_2-EtOH 1:2)

DC (Kieselgel): Chloroform-Äthanol (95:5) R_f = 0.65
Dichlormethan-Äthylacetat (9:1) R_f = 0.19
n-Hexan-Äthylacetat (4:6) R_f = 0.53

Detektion: Löschung bei 254 nm
Ehrlichs-Reagens violett
Dragendorffs-Reagens orange

$C_{20}H_{22}O_5$ Mol-Gew. (hochauflös.MS) gef.: 342.1465
ber.: 342.1466

UV (MeOH): siehe Abb. 9, S. 23

λ_{max} = 210 (ε = 14500, Endabsorption), 241 (ε = 2310) nm

IR (KBr): siehe Abb. 26, S. 49

cm^{-1}: 3140, 1505, 880 (Furan); 1755 (α,β-unges.γ-Lacton)
1645 (Doppelbindung).

CD (MeOH, c = 0.194 mg/ml) vgl.Abb. 38, S. 66

$[\Theta]_{275}$ = 0; $[\Theta]_{241}$ = -21640; $[\Theta]_{230}$ = -13961 letzte Ablesung

MS:
m/e (rel.Int. in %): M^+ 342 (2)
312 (0.5); 261 (0.7); 260 (1.2); 251 (0.7); 248 (1.6); 245 (2.5); 231 (2.1); 219 (0.8); 217 (2); 216 (2); 205 (2.5); 203 (2.1); 201 (1.8); 191 (6.8); 189 (3.4), 177 (2.8); 175 (3.1); 173 (3.1); 145 (4.7); 139 (9.8); 135 (12); 132 (16); 125 (16.5); 123 (23); 122 (19); 121 (21.5); 119 (22); 113 (18); 112 (84); 111 (40); 109 (52); 107 (33); 105 (48); 104 (67); 97 (63); 95 (78); 93 (52); 91 (61); 85 (62); 84 (61); 83 (97); 81 (82); 79 (53); 71 (100); 69 (97).

^{1}H-NMR (in $CDCl_3$, 270 MHz, TMS int.)
vgl.Abb. 27, S. 50; Entkopplungsdaten s.Tab. 4, S.34.

δ (ppm): 3.3 (1H dd J = 9/1.5 Hz) H-20a; 3.6 (1H d J = 9 Hz) H-20b; 3.88 (1H dd J = 8/2 Hz) H-18a; 4.38 (1H d J = 8 Hz) H-18b; 4.95 (1H t J = 7 Hz) H-12; 5.22 (1H s) H-17; 6.37 (1H brs) H-14; 6.75 (1H dd J = 7/2.5 Hz) H-3; 7.37 (1H brs) H-16; 7.41 (1H brs) H-15; 1.03 - 2.47 (12H).

11.4 Bacchotricuneatin D (4a)

Smp.: 109 - 111°C, farblose Nadeln (Äthylacetat-n-Hexan 1:1)

DC (Kieselgel): Chloroform-Äthanol (95:5) R_f = 0.37
Dichlormethan-Äthylacetat (9:1) R_f = 0.21

Detektion: Ehrlichs-Reagens schwarzlila

$[\alpha]_D^{25}$ = -74.1° (c = 0.581 in $CHCl_3$)

$C_{20}H_{30}O_3$ (Mol.Gew. 318) gef.: C 75.29% H 9.37%
ber.: C 75.47% H 9.43%

Mol.Gew. (hochaufl.MS) gef.: 318,2187
ber.: 318,2195

UV (MeOH): siehe Abb. 32, S. 58

λ_{max}: Endabsorption ab 217 nm

IR (KBr): siehe Abb. 30, S. 55

cm^{-1}: 3500, 3400 (OH), 3090, 1490, 870 (Furan); 1600 (Doppelbindung)

CD (MeOH, c = 0.394 mg/ml): vgl. Abb. 39, S. 66

$[\Theta]_{350-230}$ = 0

hochauflösendes MS:

m/e (Zusammensetzung, rel.Int. in %) M^+ 318 ($C_{20}H_{30}O_3$; 0.8) 300 ($C_{20}H_{28}O_2$; 2); 288 ($C_{19}H_{28}O_2$; 31); 270 ($C_{19}H_{26}O$; 1.8); 255 ($C_{18}H_{23}O$; 1.7); 205 ($C_{14}H_{21}O$; 19); 191 ($C_{13}H_{19}O$; 22); 189 ($C_{13}H_{17}O$; 2); 187 ($C_{14}H_{21}O$; 17.3); 177 ($C_{13}H_{21}$; 29); 177 ($C_{12}H_{17}O$; 24); 161 ($C_{12}H_{17}$; 31); 159 ($C_{12}H_{15}$; 27); 147 ($C_{11}H_{15}$; 13); 145 ($C_{11}H_{13}$; 20); 95 (C_6H_7O; 13); 94 (C_6H_6O; 11); 93 (C_7H_9; 100); 81 (C_5H_5O; 66). Ende der Daten.

^{1}H-NMR (in $CDCl_3$ + D_2O, 270 MHz, TMS int.)

vgl. Abb. 31, S.56; Entkopplungsdaten s.Tab. 4, S.34

δ (ppm): 1.02 (3H s) H-20; 1.04 (3H d J = 7 Hz) H-17; 1.36 (3H s) H-18; 4.03 (1H m $w_{1/2}$ = 9 Hz); H-7; 4.12 (2H brs) H-19a,b; 5.51 (1H m) H-3; 6.24 (1H brs) H-14; 7.18 (1H t J = 1 Hz) H-16; 7.34 (1H brs) H-15; 1.36 - 2.31 (14H).

^{13}C-NMR (in $CDCl_3$, 63.4 MHz, TMS int.)

siehe Abb. 34, S. 61 und Tab. 9, S. 61

δ (ppm): 148.5; 142.0; 138.4; 125.4; 121.6; 110.9 (aromatisch-olefinischer Bereich); 73.5; 63.0 (alkoh.geb. C); 46.4; 42.3; 39.6; 39.2; 38.2; 37.2; 26.4; 23.3; 19.9; 18.3; 17.3; 12.5 (aliphatisch bzw. cycloaliphatischer Bereich).

11.41 Selektive Monoacetylierung von Bacchotricuneatin D

Eine Lösung von 80 mg D in 0.5 ml Pyridin und 0.5 ml Acetanhydrid wurde nach 7minütigem Stehen bei 10°C auf Eis geschüttet. Der sich allmählich bildende Niederschlag wurde dann über präp.DC aufgearbeitet. (LM/ $CHCl_3$-EtOH 10:1; R_f 0.39)

D-Monoacetat (4b): Ausbeute 39 mg, amorph

$C_{22}H_{32}O_4$ Mol.Gew. 360

MS:
m/e (Int in %): 360 (M^+, 0.4); 300 (M^+-60;4); 266 (4); 145 (16); 95 (24); 91 (39); 81 (33).

UV (MeOH): λ_{max}: Endabsorption

IR (KBr): cm^{-1} 3480 (OH), 1730 (Acetat), 3120, 1495, 850 (Furan), 1630 (Doppelbindung).

^{1}H-NMR (in $CDCl_3$ + D_2O, 270 MHz, TMS int.) s.Tab.4, S.34
δ (ppm): 1.02 (3H s) H-20; 1.05 (3H d J = 7 Hz); 1.34 (3H s) H-18; 2.07 (3H s) Acetat; 4.0 (1H m $w_{1/2}$ = 9 Hz) H-7; 4.5 (2H brs) H-19a,b; 5.52 (1H m) H-3; 6.23 (1H brs) H-14; 7.18 (1H brs) H-16; 7.34 (1H brs) H-15.

11.42 Jones Oxidation von 4b zum Monoacetatketon (4c)

Zu einer eisgekühlten Lösung von 25 mg D-Monoacetat (4b) in 5 ml Aceton wurden unter Rühren 3 Tr. JONES-Reagens (153) (70.0 g CrO_3/500 ml H_2O, gemischt mit 61 ml H_2SO_4 96%) getropft. Nach weiteren 5 Min. Rühren wurde das überschüssige Oxidationsmittel durch Zugabe von 10 Tr. Methanol zerstört. Das Lösungsmittel wurde im Vakuum abrotiert, der Rückstand mit Eiswasser verdünnt und mehrmals mit Chloroform extrahiert. Die gewaschene und getrocknete Chloroformphase ergab nach dem Einengen einen Rückstand, der über präp.DC gereinigt wurde (LM: $CHCl_3$-EtOH 24:1; R_f 0.43).

Monoacetatketon (4c) Ausbeute 13 mg

$C_{22}H_{30}O_4$ Mol.Gew. (hochaufl.MS) gef.: 358,2773
ber.: 358,2143

UV (MeOH) λ_{max} = 278 (ε = 38.5) nm und Endabsorption

IR (Film) cm^{-1}: 3130, 1500, 850 (Furan), 1735 (Acetat), 1710 (Keton), 1630 (Doppelbindung).

CD (MeOH, c = 0.409 mg/ml) vgl.Abb. 39, S. 66

$[\Theta]_{318} = 0$; $[\Theta]_{291} = -6150$; $[\Theta]_{253} = 0$;

Hochauflösendes MS:

m/e (Zusammensetzung, rel.Int. in %) M^+ 358 ($C_{22}H_{30}O_4$; 0.3)

312 ($C_{20}H_4O_3$; 1.2); 298 ($C_{20}H_{26}O_2$; 14); 277 ($C_{16}H_{21}O_4$; 2); 263 ($C_{16}H_{23}O_3$; 8.6); 227 ($C_{16}H_{19}O$; 2.6); 219 ($C_{14}H_{19}O_2$; 6.8); 203 ($C_{14}H_{19}O$; 100); 201 ($C_{14}H_{17}O$; 21); 189 ($C_{13}H_{17}O$; 6.6); 187 ($C_{13}H_{15}O$; 5); 186 ($C_{14}H_{17}$; 6); 175 ($C_{13}H_{19}$; 8.3); 175 ($C_{12}H_{15}O$; 4.5); 147 ($C_{11}H_{15}$; 6.5); 145 ($C_{11}H_{13}$; 12); 131 ($C_{10}H_{11}$; 9); 123 ($C_8H_{11}O$; 10); 119 (C_9H_{11}; 30); 107 (C_8H_{11}; 23); 95 (C_6H_7O; 41); 94 (C_6H_6O; 5.7); 93 (C_7H_9; 23); 81 (C_5H_5O; 57).

^{1}H-NMR (in $CDCl_3$ + D_2O, 270 MHz, TMS int.)

vgl. auch Tab.4, S. 34

δ (ppm): 0.75 (3H s) H-20; 0.97 (3H d J = 7 Hz) H-17; 1.06 (3H s) H-18; 2.05 (3 H s) Acetat; 2.66 (1H q J = 7 Hz) H-8; 4.49 (2H brs) H-19a,b; 5.7 (1H m $w_{1/2}$ = 9 Hz) H-3; 6.26 (1 H brs) H-14; 7.22 (1H brs) H-16; 7.37 (1H brs) H-15.

11.43 MnO_2-Oxidation von D zum Aldehydalkohol (4d)

Eine Lösung von 20 mg D in 7 ml $CHCl_3$ wurde bei Raumtemperatur mit frisch bereitetem MnO_2 solange gerührt, bis alles Ausgangsmaterial laut DC oxidiert war (8 Stdn.).
(LM: $CHCl_3$EtOH 95:5; R_f 0.63; Detektion: Löschung bei 254 nm, Ehrlichs und Dragendorffs Reagens positiv).

Die Mischung wurde abfiltriert, der Rückstand sorgfältig mit $CHCl_3$ gewaschen. Nach dem Abdampfen des $CHCl_3$ wurde der Rückstand über präp. DC gereinigt.
(LM: $CHCl_3$-EtOH 19:1, 2mal entwickelt, R_f 0.32).
Ausbeute: 12 mg.

Aldehydalkohol (4d)

$C_{20}H_{28}O_3$ Mol.Gew.(hochaufl.MS) gef.: 316.2018
ber.: 316.2037

UV (MeOH) s.Abb. 32, S. 58

λ_{max} = 217 (ε = 10800) nm, Endabsorption

IR (Film):

cm^{-1}: 3135, 1500, 850 (Furan),3480 (OH), 1680 (α,β-unges. Aldehyd), 1620 (Doppelbindung).

Hochauflösendes MS:
m/e (Zusammensetzung, rel.Int. in %) M^+ 316 ($C_{20}H_{28}O_3$; 18.3) 301 ($C_{19}H_{25}O_3$; 4); 298 ($C_{20}H_{26}O_2$; 5.2); 283 ($C_{19}H_{23}O_2$; 4.3); 265 ($C_{18}H_{21}O_2$; 3.5); 243 ($C_{16}H_{19}O_2$; 13.6); 219 ($C_{14}H_{19}O_2$; 100); 205 ($C_{14}H_{21}O$; 4.8); 203 ($C_{14}H_{19}O$; 45.6); 189 ($C_{13}H_{17}O$; 5.3); 185 ($C_{14}H_{17}$; 13); 177 ($C_{13}H_{21}$; 9); 177 ($C_{12}H_{17}O$; 4); 175 ($C_{13}H_{19}$; 10); 173 ($C_{13}H_{17}$; 6.4); 161 ($C_{12}H_{17}$; 8.6); 159 ($C_{12}H_{15}$; 12.3); 157 ($C_{12}H_{13}O$; 11); 149 ($C_{10}H_{13}O$; 9.1);

147 ($C_{11}H_{15}$; 5.8); 147 ($C_{10}H_{11}O$; 11) 145 ($C_{11}H_{13}$; 12.5); 135 ($C_9H_{11}O$; 13.5); 133 ($C_{10}H_{13}$; 16.5); 129 ($C_{10}H_9$; 6); 119(C_9H_{11}; 20); 109 (C_7H_9O; 31); 105 (C_8H_9; 27); 95 (C_6H_7O; 42); 94 (C_6H_6O; 11); 93 (C_7H_9; 40); 81 (C_5H_5O; 86.8); 69 (C_5H_9; 25).

^{1}H-NMR (in $CDCl_3$ + D_2O, 270 MHz, TMS int.)

vgl. auch Tab. 4, S. 34

δ (ppm): 1.03 (3Hs) H-20; 1.07 (3H d J = 7 Hz) H-17; 1.44 (3H s) H-18; 4.04 (1H m $w_{1/2}$ = 9 Hz) H-7; 6.55 (1H dd J = 5/4 Hz) H-5; 6.24 (1H brs) H-14; 7.31 (1H brs) H-16; 7.34 (1H brs) H-15; 9.3 (1H brs) H-19.

11.5 Cirsiliol (F_1)

Smp.: 273 - 275°C (MeOH) Lit.: 278°C (111,112)

DC Kieselgel: Chloroform-Methanol (9:1) R_f = 0.40
Äthylacetat-Ameisenssäure-Wasser (10:2:3) R_f = 0.66

Detektion: Naturstoffreagens nach NEU orange

$C_{17}H_{14}O_7$ (330.21)

MS: charakteristische Fragmente bei m/e 330 (M^+), 181, 135

UV:

T a b e l l e 14

Lösungsmittel + Reagens	λ_{max} (nm)			
MeOH	241	255	272	344
$AlCl_3$	241	274	309 sh	436
NaAcetat	269	405		
H_3BO_3/NaAc	261	371		

^{1}H-NMR (60 MHz, DMSO-d_6, TMS int.)

δ (ppm): 3.79 (C-6 OMe);3.95 (C-7 OMe); 6.70 (H-8); 6.83 (H-3); 6.98 b (H-5'); 7.46 m (H-2'; H-6').

11.6 Cirsimaritin(F_2)

Smp.: 254 - 256°C (EtOH) Lit.: 255 - 257°C (113,114)

DC Kieselgel: Chloroform-Methanol (9:1) R_f = 0.56
Äthylacetat-Ameisensäure-
Wasser (10:2:3) R_f = 0.84

Detektion: Naturstoffreagens nach NEU gelbgrün

$C_{17}H_{14}O_6$ (314.71)

MS: charakteristische Fragmente bei
m/e 314 (M^+), 181, 119
UV:

T a b e l l e 15

Lösungsmittel + Reagens	λ_{max} (nm)		
MeOH	213	274	333
$AlCl_3$	289 sh	300 sh	364
$AlCl_3$/HCl	285	300 sh	356
Na-Acetat	272	298 sh	388
Na-Methylat	274	303 sh	355

^{1}H-NMR (60 MHz, DMSO-d_6, TMS int.)

δ (ppm): 3.83 (C-6 OMe); 4.03 (C-7 OMe); 6.87 (H-3); 6.98 (H-8); 7.08 d (H-3', H-5'); 8.11 d (H-2', H-6').

Für die Hilfe bei der Isolierung und Spektreninterpretation der Flavone möchte ich Herrn Dr.O.Seligmann und Herrn Dr.M. Ilyas sehr herzlich danken.

11.7 Scopoletin (S_1)

Smp.: 205°C ($CHCl_3$) Lit.: 204 - 205°C

Mischschmelzpunkt keine Depression

DC Kieselgel: Chloroform-Äthanol (95:5) R_f = 0.57

Detektion: stark hellblaue Fluoreszenz bei 254 und 360 nm.

$C_{10}H_8O_4$ (192.1) gef.: C 62.48% H 4.27%
ber.: C 62.50% H 4.20%

UV (MeOH): λ_{max} 229, 253, 296 und 345 nm

12.0 DC-Identifizierungen

12.1 Scopolin (S_2)

Aus dem Methanolextrakt der Droge (nach 9.11) wurde mit präparativer DC (LM: $CHCl_3$-MeOH 7:3) die Cumarinzone S_2 (R_f 0.38) eluiert und das Eluat mit 2n HCl hydrolisiert. In dem neutralen Hydrolysat (nach 9.12) war chromatographisch Scopoletin und Glucose nachzuweisen (nach 7.13).

Im DC erwies sich S_2 bei Vergleichen mit authentischem Scopolin als identisch.

Tabelle 16

Laufmittel	R_f S_2/Scopolin
Äthylacetat-Ameisensäure-Wasser 10:2:3	0.40
Bittner	0.32
Äthylacetat-Äthylmethylketon-Wasser-Ameisensäure 5:3:1:1	0.47

12.2 Chlorogen- und Kaffeesäure

Ebenso konnten Chlorogen- und Kaffeesäure im Methanolextrakt (nach 9.11) mit Hilfe chromatographischer R_f- und Detektionsvergleiche mit Testsubstanzen identifiziert werden.

Tabelle 17

	Laufmittel	R_f Chlorogens.	R_f Kaffees.
Kieselgel	ÄAW 10:2:3	0.65	0.47
Kieselgel	Benzol-MeOH-Essigs. 45:8:4	0.42	0.37
Polyamid	Äthylac.-Äthylmethylketon-Ameisensäure 82:9:9	0.44	0.24

13.0 Pharmakologische Untersuchungen

13.1 Screening von Baccharis-Extrakten auf Antitumor-Wirksamkeit

(ausgeführt am National Cancer Institute, Bethesda, Maryland, U.S.A., unter Leitung von Dr.M.Suffness)

Zur Untersuchung gelangten eine Chloroform- und Äthanol-Fraktion von Baccharis tricuneata.

300.0 g gepulverte Droge wurden 12 Stdn. mit Petroläther entfettet und anschließend mit 95%igem Äthanol 13 Stdn. am Soxhlet extrahiert. 1/3 des zur Pastenform eingeengten Äthanol-Extraktes wurde als Äthanol-Fraktion A zur Untersuchung verwendet.

Die anderen 2/3 wurden zwischen je 200 ml Chloroform und Wasser verteilt. Die eingeengte Chloroformphase gelangte als Chloroform-Fraktion B zur Untersuchung.

Testsysteme waren:

a) in vitro "System KB-Human epidermoid carcinoma of the nasopharynx (cell culture)"

b) in vivo "System P 388 lymphocytic leukemia of the mouse"

Ausführliche Versuchsmethodik siehe Ref. (154).

13.2 In-vitro-Prüfung von Extraktfraktionen auf Hemmung der ^{3}H-Thymidin-Einbauraten in Ascites

(Die Untersuchungen erfolgten am Institut für Pharmazie und Lebensmittelchemie der Universität München; Ausführung: Frau Dr.K.Jurcic, Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München)

13.21 Auftrennung der Äthanolfraktion (A)

40 g der Äthanolfraktion A (nach 13.1, S.115) wurden in 400 ml Äthanol/Wasser 50% gelöst und erschöpfend mit n-Hexan (70 Stdn.) und anschließend mit Äther (78 Stdn.) perforiert. Der Rückstand wurde vom org.Lösungsmittel befreit, erneut mit 200 ml Wasser versetzt und mit Äthylacetat 82 Stdn. perforiert. Alle Extraktfraktionen wurden gefriergetrocknet.

n-Hexan-Fraktion	(C)	3.0 g
Äther-Fraktion	(D)	23.2 g
Äthylacetat-Fraktion	(E)	5.6 g
Wasser-Fraktion	(F)	2.1 g

13.22 ^{3}H-Thymidin-Inkubation und Messung der Einbauraten in Asciteszellen

Die Inkubation mit radioaktivem Präcursor erfolgte nach einem modifizierten Verfahren von WEITZEL et al. (118) bei 37°C.

Ein Inkubationsansatz enthielt:

1 ml Zellsuspension von Walker-256-Carcinosarkom-Ascites in "Minimal Essential Medium" nach H.EAGLE (2×10^{6} Zellen/ml)

0.5 ml Drogenextraktsuspension (10 mg Trockenextrakt der Droge in 5 ml phys.NaCl-Lsg. mit Ultraschall suspendiert), entsprechend 2 mg Drogenextrakt/ml

0.1 ml ^{3}H-Präcursor (spez.Akt. 50.8 Ci/mMol), entsprechend 1 µCi.

Bei den Einbaustudien wird die Zellsuspension 2 Stdn. mit den Drogen-Extrakten vorinkubiert. Anschließend wird 1 Stde. mit dem Präcursor unter Schütteln inkubiert.

Nach dieser Zeit wird der Einbau gestoppt, indem der Ansatz mit 4n Perchlorsäure bis zur vollständigen Ausflockung versetzt wird. Man läßt über Nacht stehen. Die Niederschläge, die die eingebauten Präcursoren enthalten, werden anschließend auf Glasfaserfilter (Ø = 25 mm) abgesaugt, 2mal mit 5% Trichloressigsäure und 1mal mit Äthanol gewaschen. Die Filter werden in Polyäthylenfläschchen gebracht und die Aktivitäten im Toluol-Scintillator gemessen. Die Ergebnisse werden gegen die Kontrolle verglichen und die Hemmeffekte in % ausgedrückt.

13.3 In-vitro-Untersuchung auf Virus-hemmende Wirkung im Zellkulturversuch

(Die Untersuchungen erfolgten am Institut für Virusforschung und Experimentelle Medizin, Eutin, Leitung Prof. Dr.Dr.A.Lembke).

Zur Untersuchung kam ein Äthanolextrakt von Baccharis tricuneata, hergestellt durch 10tägige Mazeration von Drogenpulver mit Äthanol 70% im Verhältnis 1:5 (Vorschrift: Tinkturen, DAB 7).

Zellkultur-Medium:
Zellstamm "Girardi heart Flow", kultiviert in Eagle's Basalmedium (155) mit einem Zusatz von 10% Kälberserum. Eine Zugabe von Antibiotika ist nicht erforderlich.

Versuchstemperatur:
37°C, Atmosphäre mit 5% CO_2 angereichert.
Versuchsansatz mit Virus "Adeno Typ 6", Zahl der Virusteilchen/Ansatz: 5×10^6.

Die Zugabe des Drogenextraktes zum Zellkultur-Medium erfolgte in abgestuften Konzentrationen von 1×10^{-1} - 1×10^{-10} g Extrakt. Dazu wurde eine Kontrollversuchsreihe unter gleichen Bedingungen ohne Drogenzugabe durchgeführt.

Die Bewertung der Versuche erfolgte durch mikroskopische Charakterisierung des Zellrasens (s.S. 75).

Versuchsansätze:

a) Zellkultur-Nährmedium und Drogenextrakt wurden 4 Tage bei 37°C bebrütet: Auswertung der Cytotoxizität

b) dto., Auswertung der Cytotoxizität nach 6 Tagen Bebrütung

c) Zellkultur-Nährmedium, Drogenextrakt und Virussuspension wurden 6 Tage bebrütet: Auswertung der Cytoxizität und Hemmung der Virusaktivität

d) Die Drogenextraktverdünnungen und Virussuspension wurden 1 Stde. bei 37°C vorinkubiert. Dann wurde die Mischung auf das vorbereitete Zellkultur-Nährmedium übertragen. Auswertung der Cytotoxizität und Hemmung der Virusaktivität nach 6 Tagen.

Die Ergebnisse sind in Tab. 11, S.77, wiedergegeben.

Für die Durchführung der pharmakologischen Untersuchungen und die Diskussion der Versuchsergebnisse danke ich Herrn Professor Dr.Dr.A.Lembke, Frau Dr.K.Jurcic und dem National Cancer Institute sehr herzlich.

L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

1) J.CUATRECASAS, Webbia 24, 1 (1969)
2) H.GARCIA-BARRIGA, Flora Medicinal de Colombia, Bogota 1975, Bd. 3, S. 315
3) A.ENGLERS,Syllabus der Pflanzenfamilien, Bd. 2, Gebrüder Borntträger, Berlin 1964
4) J.CUATRECASAS, Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Fisicas y Naturales, 13, 5 (1967)
5) J.CUATRECASAS, ibid., 13, 201 (1968)
6) G.DRAGENDORFF, Die Heilpflanzen der verschiedenen Völker und Zeiten, Werner Fritsch Verl., München 1967, S. 664
7) A.BALBACH, A Flora Nacional Na Medicina Domestica, Edicoes A Edificacao do Lar, S. Paolo 1963, Bd. 1, S. 276, 461
8) J.L.HARTWELL, Lloydia, 31, 71 (1968)
9) H.A.HOPPE, Drogenkunde, Walter de Gruyter Verl., Berlin-New York 1975, Bd. 1, S. 149
10) N.H.BARBARA, R.A.CADENAS und P.T.GARCIA, Phytochemistry 13, 671 (1974)
11) A.DELAVY, Las Plantas Medicinales y las Enfermedades Incurables, Bogota 1972, S. 11, 14
12) E.P.BENIMELLI, Annales Fac.Quim.Farm.Univ.Chile, 16, 133 (1964)
13) W.HERZ, A.PILOTTI, A.SÖDERHOLM, I.K.SHUHAMA und W.VICHNEVSKI, J.Org.Chem., 42, 3913 (1977)
14) E.A.MOREIRA, C.C.KELLER, R.KRAMBECK und O.G.MIGUEL, Trib.Farm. (Brazil), 43, 3 (1975)
15) H.WAGNER, M.A.IYENGAR und W.HERZ, Phytochemistry, 11, 444(1972)
16) G.STAPEL und H.G.MENSSEN, Planta Med.(J.Med.Plant Res.), 1, 20 (1977)
17) J.KAVKA, E.GUERREIRO, O.S.GIORDANO und J.ROMO, Rev.Latinoameric. Quim., 4, 101 (1973)
18) M.SILVA, J.M.MUNDACA, P.G.SAMMES, Phytochemistry, 10, 1942 (1971)
19) S.M.KUPCHAN, E.BAUERNSCHMIDT, Phytochemistry, 10, 664 (1971)
20) S.M.KUPCHAN, B.B.JARVIS, R.G.DAILEY JR., W.BRIGHT, R.F.BRYAN und Y.SHIZURI, J.Am.Chem.Soc., 98, 7092 (1976)
21) S.M.KUPCHAN, D.R.STREELMAN, B.B.JARVIS, R.G.DAILEY JR., und A.T.SNEDEN, J.Org.Chem., 42, 4221 (1977)
22) S.RIBEIRO DOS SANTOS, T.R.MOLLAN, A.J.DANDREA PINTO, C.C.BRIHO, M.R.DONALISIO und C.J.DE SOUZA, Riv.Ital.Essenze-Profumi, Piante Offic., Aromi-Saponi, Cosmet.-Aerosol., 98, 428 (1966)
23) A.L.MONTES, Annales Soc.Cienti Arg., 176, 71 (1963)
24) R.FAVRE, Phytochemistry, 12, 1515 (1975)
25) L.GIVAUDAN, ref.C.A. 58, 5731 (1963)
26) Y.R.NAVES, Bull.Soc.Chim.France, 1871 (1959)
27) F.BOHLMANN und C.ZDERO, Tetrahedron Lett., 2419 (1969)
28) F.BOHLMANN und C.ZDERO, Chem.Ber., 109, 1450 (1976)
29) M.MIYAKADO, T.KATO, N.OHNO und T.J.MABRY, Phytochemistry, 15, 846 (1976)
30) C.GUERREIRO und A.ROMO DE VIVAR, Rev.Latinoamer.Quim., 4, 178 (1973)
31) X.A.DOMINGUEZ, H.SANCHEZ, B.A.MERIJANIAN und P.M.ROCHAS, Phytochemistry, 11, 2628 (1972)
32) F.BOHLMANN und C.ZDERO, Chem.Ber., 103, 2327 (1970)

33) R.HEGNAUER, Chemotaxonomie der Pflanzen, Birkhäuser-Verlag, Basel u.Stuttgart, 1964, Bd. 3, S. 486
34) M.RICARDI, Bol.Soc.Biol.de Concepcion (Chile), 33, 29 (1958)
35) P.CASPARIS und W.MARTIN, Pharm.Acta Helv., 6, 251 (1931)
36) L.RAGONESE, Rev.Fac.Agron.Univ.Nac.La Plata, 31, 133 (1955)
37) E.A.MOREIRA, Tribuna Farm., 34, 27 (1966)
38) G.M.MONTES, F.T.WILKOMIRSKI, R.L.VALENZUELA und M.R.NEIRA, Rev.Real Acad.Cienc.Exactas, Fis.Natur.Madrid, 65 (2), 499 (1971)
39) E.A.MOREIRA, C.C.KELLER, R.KRAMBECK und O.G.MIGUEL, Tribuna Farm., 43, 3 (1975)
40) J.SMOLENSKI, H.SILINIS und N.R.FARNSWORTH, Lloydia, 38, 497 (1975)
41) V.P.WHITTAKER und S.WIJESUNDERA, Biochem.J., 51, 348 (1952)
42) S.BALDT, Dissertation, München 1974, S. 17, 21
43) R.NEU, Naturwiss., 44, 181 (1957)
44) R.TSCHESCHE und G.WULFF, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Herausgeb. W.HERZ, H.GRISEBACH und G.W.KIRBY, Springer-Verl., Wien-New York 1973, Bd. 30, S. 464
45) K.HILLER, M.KEIPERT und B.LINZER, Pharmazie 21, 713 (1966)
46) N.R.FARNSWORTH, J.Pharm.Sci., 55, 225 (1966)
47) N.R.FARNSWORTH, N.A.PILEWSKI und F.J.DRAUS, Lloydia 25, 312 (1962)
48) L.A.ANDERSON, N.S.DOGGETT und M.S.F.ROSS, Planta med. 32, 125 (1977)
49) J.E.BUSH und D.A.H.TAYLOR, Biochem.J., 52, 643 (1952)
50) T.REICHSTEIN, Helv.Chim.Acta, 15, 1110 (1932)
51) M.S.HENDERSON und R.McCRINDLE, J.Chem.Soc. C, 2014 (1969)
52) G.SAVONA, F.PIOZZI, J.R.HANSON und M.SIVERNS, J.Chem.Soc. Perkin I, 497 (1977)
53) P.Y.MALAKOV, G.Y.PAPANOV und N.MOLLOV, Tetrahedron Lett., 23, 2025 (1978)
54) C.H.BRIESKORN und T.STEHLE, Chem.Ber., 106, 922 (1973)
55) CH.J.POUCHERT, The Aldrich Library of Infrared Spectra, Aldrich Chemical Company Inc., USA 1970, S. 877
56) H.BUDZIKIEWICZ, C.DJERASSI und D.H.R.WILLIAMS, Structure Elucidation of Natural Products by Mass Spectrometry, Holden-Day Inc., San Francisco 1964, Bd. 2, S. 155
57) L.J.BELLAMY, Ultrarotspektrum und chemische Konstitution, Dr.Steinkopf-Verl., Darmstadt 1966
58) A.J.SCOTT, Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products, Pergamon Press, Oxford 1964, S. 135
59) A.J.SCOTT, Interpretation of The Ultraviolet Spectra of Natural Products, Pergamon Press, Oxford 1964, S. 79
60) H.GÜNTHER, NMR-Spektroskopie, Verlag Georg Thieme, Stuttgart 1973, S. 69 ff.
61) F.BOHLMANN und M.GRENZ, Chem.Ber., 105, 3123 (1973)
62) P.R.JEFFERIES und T.G.PAYNE, Tetrahedron Lett., 4777 (1967)
63) J.T.PINHEY, R.F.SIMPSON und I.L.BATEY, Austr.J.Chem., 25, 2621 (1972)
64) R.TSCHESCHE und H.U.PLENIO, Chem.Ber., 106, 2929 (1973)
65) R.TSCHESCHE und B.STREUFF, Chem.Ber., 111, 2130 (1978)
66) D.P.POPA und L.A.SALEI, Khim.Prirodn.Soedin., 3, 399 (1976)
67) D.BILLET, M.DURGEAT, S.HEITZ und A.AHOND, Tetrahedron Lett., 3825 (1975)
68) G.AGUILAR-SANTOS, Chem.and Ind., 1074 (1965)
69) G.SAVONA, M.P.PATERNOSTRO, F.PIOZZI, J.R.HANSON, P.B.HITCHCOCK und S.A.THOMAS, J.Chem.Soc. Perkin I, 643 (1978)

70) D.H.R.BARTON und ELAD, J.Chem.Soc.(London), 2085 (1956)
71) W.R.CHAN, D.R.TAYLOR und C.R.WILLIS, J.Chem.Soc. C, 2781 (1968)
72) C.H.BRIESKORN und TH.PFEUFFER, Chem.Ber., 100, 1998 (1967)
73) R.I.REED und W.K.REID, J.Chem.Soc., 5933 (1963)
74) B.A.BURKE, W.R.CHAN, E.C.PRINCE, P.S.MANCHAND, N.EICKMAN und J.CLARDY, Tetrahedron, 32, 1881 (1976)
75) E.FUJITA, I.UCHIDA und T.FUJITA, J.Chem.Soc. Perkin I, 1547 (1974)
76) L.E.ERICKSON, L.Amer.Chem.Soc., 87, 1867 (1965)
77) H.FRIEBOLIN, NMR-Spektroskopie, Verlag Chemie, Weinheim/ Bergstraße 1974, S. 52
78) G.SAVONA, F.PIOZZI, J.R.HANSON und M.SIVERNS, J.Chem.Soc. Perkin I, 1607 (1976)
79) G.SAVONA, S.PASSANANTI, M.P.PATERNOSTRO, J.R.HANSON, P.B. HITCHCOCK und M.SIVERNS, J.Chem.Soc. Perkin I, 356 (1978)
80) P.Y.MALAKOV, G.Y.PAPANOV, N.M.MOLLOV und S.L.SPASSOV, Symposium Papers of the 11th International Symposium on Chemistry of Natural Products, Bd. 2, S. 305
81) S.O.ALMQUIST, C.R.ENZELL und F.W.WEHRLI, Acta Chem.Scand. B, 29, 695 (1975).
82) E.BREITMAIER und G.BAUER, Pharmazie, 5, 97 (1976)
83) F.J.WEIGERT und J.D.ROBERTS, J.Amer.Chem.Soc., 92, 1347 (1970)
84) P.MAIN, M.WOOLFSON, L.LESSINGER und G.GERMAIN, MULTAN 74 A System of Computer Programs
85) L.LESSINGER, Acta Cryst. A, 32, 538 (1976)
86) W.HERZ, P.S.SUBRAMANIAM, R.MURARI, N.DENNIS und J.F.BLOUNT, J.Org.Chem., 42, 1720 (1977)
87) W.HERZ, K.AOTA, M.HOLUB und Z.SAMEK, J.Org.Chem., 35, 261(1970)
88) L.M.JACKMAN und S.STERHELL, Applications of Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy in Organic Chemistry, Pergamon Press, Oxford 1969, S. 288 ff.
89) D.P.POPA, F.TKHUKAN und L.A.SALEI, Khim.Prirodn.Soedin (engl. ed) 1, 42 (1977)
90) C.E.McEACHAN, A.T.McPAIL und G.A.SIM, J.Chem.Soc. B, 853 (1966)
91) F.BOHLMANN, M.GRENZ und Helmut SCHWARZ, Chem.Ber., 106, 2479 (1973)
92) A.J.SCOTT, Interpretation of the Ultraviolet Spectra of Natural Products, Pergamon Press, Oxford 1964, S. 77
93) S.DE ROSA, L.MINALE, R.RICCIO und G.SODANO, J.Chem.Soc. Perkin I, 1408 (1976)
94) F.BOHLMANN und CH.ZDERO, Phytochemistry, 16, 1583 (1977)
95) G.SAVONA, S.PASSANANTI, M.P.PATERNOSTRO, F.PIOZZI, J.R.HANSON und M.SIVERNS, Phytochemistry, 17, 320 (1978)
96) J.R.HANSON, Chemistry of Terpenes and Terpenoids, Herausg. A.A.NEWMAN, Academic Press, London-New York 1972, S. 155
97) S.DEV, Some Recent Developments in the Chemistry of Natural Products, Herausgeber S.RANGASWAMI und N.V.SUBBA RAO, Prentice Hall of India, New Delhi 1972, S. 308
98) L.RUZICKA, Experientia, 9, 357 (1953)
99) N.J.NICHOLAS in Phytochemistry, Organic Metabolites, Bd. 1, Herausgeber C.P.MILLER, van Nostrand Reinhold Company, New York 1973, S. 283
100) J.R.HANSON, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Herausg. W.HERZ, H.GRISEBACH und G.W.KIRBY, Springer-Verl. Wien-New York 1971, Bd. 29, S. 395

101) A.J.HAAGEN-SMIT, Fortschritte der Chemie organischer Naturstoffe, Herausg. L.ZECHMEISTER, Springer-Verl., Wien 1955, Bd. 12, S. 26
102) J.R.HANSON in Progress in Phytochemistry, Bd. 3, Herausgeb. L.REINHOLD und Y.LIWSCHITZ, Interscience, London-New York 1972, S. 231
103) S.R.WILSON, L.A.NEUBERT und J.C.HUFFMANN, J.Amer.Chem.Soc., 98, 3669 (1976)
104) R.MISRA, R.C.PANDEY und S.DEV, Tetrahedron Lett., 2681 (1968)
105) H.WOLF, Tetrahedron Lett., 5151 (1966)
106) G.SNATZKE, Persönliche Mitteilung, 1977
107) D.E.U.EKONG und I.J.OKOGUN, Chem.Comm., 72 (1967)
108) R.CAPUTO und L.MANGONI, Phytochemistry, 13, 467 (1974)
109) W.MOFFITT, R.B.WOODWARD, A.MOSCOWITZ, W.KLYNE und C.DJERASSI, J.Amer.Chem.Soc., 83, 4013 (1961)
110) D.N.KIRK und W.KLYNE, J.Chem.Soc. Perkin I, 1076 (1974)
111) C.H.BRIESKORN und W.BIECHELE, Arch.Pharm., 304, 357 (1971)
112) N.MORITA, M.SHIMIZU und M.ARIZAWA, Phytochemistry, 12, 421 (1973)
113) C.H.BRIESKORN und W.BIECHELE, Tetrahedron Lett., 2603 (1969)
114) J.W.WALLACE und B.A.BOHM, Phytochemistry, 10, 452 (1971)
115) B.J.ABBOT, Bioassay of Plant Extracts for Anticancer Activity, Cancer Treatment Reports, 60, 1007 (1976)
116) L.J.DIETRICH, Cancer Research, 21, 502 (1961)
117) H.B.SEIDENBERGER, Dissertation in Vorbereitung, München 1978
118) G.WEITZEL, F.SCHNEIDER, A.M.FRETZDORFF, J.DURST und W.D. HIRSCHMANN, Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem., 348, 433 (1967)
119) H.J.EGGERS, Münchner med.Wschr., 108, 1645/1652 (1966)
120) J.F.ENDERS, Ann.Rev.Microbiol., 8, 473 (1954)
121) F.RAPP, J.L.MELNICK, Cells and Tissue in Culture, 3, 263/316 (1966)
122) S.M.KUPCHAN, J.R.KNOX u. M.S.UDAYAMURTHY, J.Pharmac.Sci., 54, 929 (1965)
123) S.M.KUPCHAN, C.W.SIGEL, J.R.KNOX und M.S.UDAYAMURTHY, J.Org.Chem., 34, 1460 (1969)
124) S.M.KUPCHAN, C.W.SIGEL, J.R.HEMINGWAY, J.R.KNOX und M.S.UDAYAMURTHY, Tetrahedron, 25, 1603 (1969)
125) O.STICHER in New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity, Herausgeber H.WAGNER und P.WOLFF, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1977, S. 157
126) D.H.R.BARTON, H.C.CHEUNG, A.D.CROSS, L.M.JACKMANN und M.M. SMITH, Proc.Chem.Soc., 76 (1961)
127) D.H.R.BARTON, H.C.CHEUNG, A.D.CROSS, L.M.JACKMANN und M.M. SMITH, J.Chem.Soc. 5061 (1961)
128) M.SUMIMOTO, Tetrahedron, 19, 643 (1963)
129) W.COCKER, Pflanzliche Bitterstoffe, Vorträge zur 14.Tagung der Deutschen Gesellschaft für Arzneiforschung, P.M.Supplement 1966, S. 78
130) W.C.CUTTING, R.H.DREISBACH und B.J.NEFF, Stanford Med.Bull., 7, 137 (1949)
131) W.C.CUTTING, R.H.DREISBACH, M.AZIMA, B.J.NEFF, B.J.BROWN und J.WRAY, Stanford Med.Bull., 9, 236 (1951)
132) W.C.CUTTING, R.H.DREISBACH und F.MATSUSHIMA, Stanford Med. Bull., 11, 227 (1953)

133) A.WACKER und H.G.EILMES, Arzneim.Forsch./Drug res., 28, 347 (1978)
134) K.BÖHM, Die Flavonoide, Scitio Cantor KG, Aulendorf/Württ. 1967, S. 80 ff.
135) R.DAVOLI und M.TERNI, Boll.Ist.sieroterap.milanese, 27, 142 (1948); C.A., 43, 4327 (1949)
136) M.PASSERINI und G.MAZZETTI, Boll.Ist.sieroterap.milanese, 26, 145 (1947); C.A., 43, 4327 (1949)
137) M.TERNI und Z.QUARATINI, Boll.Ist.sieroterap.milanese, 30, 689 (1951)
138) M.TERNI und Z.QUARATINI, Boll.Ist.sieroterap.milanese, 31, 55 (1952)
139) J.LEDERBERG, J.Bacteriol. 63, 399 (1952)
140) O.L.OZERESKOVSKAYA, Prikl.Biokhim.Microbiol., 4 (6), 698 (1968)
141) H.WAGNER, R.SEITZ, V.M.CHARI, H.LOTTER und W.HERZ, Tetrahedron Lett. 3039 (1977)
142) H.WAGNER, R.SEITZ, H.LOTTER und W.HERZ, J.Org.Chem., 43, 3339 (1978)
143) E.STAHL, Dünnschichtchromatographie, Springer-Verlag Berlin-Heidelberg-New York, 1967, Reagentienliste
144) P.J.STEVENS, J.Chromatog., 14, 269 (1964)
145) R.TSCHESCHE, J.Chromatog., 5, 217 (1961)
146) H.REZNIK und K.EGGER, Z.anal.Chem., 183, 196 (1961)
147) Praktikumsvorschriften des Instituts für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München
148) S.M.PATRIDGE, Nature, 167, 443 (1949)
149) R.MUNIER und M.MACHEBOEUFF, Bull.Soc.chim.biol. 33, 846 (1951)
150) R.MUNIER, Bull.Soc.chim.France, 19, 852 (1952)
151) J.TRAVELL, J.Pharm.Sci., 33, 689 (1934)
152) B.T.CROMWELL in K.PEACH und M.V.TRACY, Modern Methods of Plant Analysis, Bd. IV, Springer-Verlag, Berlin-New York 1955, S. 373
153) K.BOWDEN, J.M.HEILBRON, E.R.H.JONES und D.C.L.WEEDON, J.chem.Soc.,39 (1946)
154) R.I.GERAN, N.H.GREENBERG, M.M.MACDONALD, A.M.SCHUMACHER und B.J.ABBOTT, Cancer Therapy Reports Part 3, Protocols für Screening Chemical Agents and Natural Products against Animal Tumors and Other Biological Systems, Bd. 3, 1972, S. 9, 17
155) C.P.STANNERS et al., Nature New Biology, 230, 52 (1971)
156) A.L.BANDONI, J.E.MEDINA, R.V.D.RONDINA und J.D.COUSSIO, Planta med., 34, 328 (1978)

L E B E N S L A U F

Renate S e i t z , geb. Kolb geboren am 26.2.1945
in Fürstenfeldbruck
Eltern: Hans Kolb, Apotheker
Therese Kolb geb. Weiß
verheiratet seit April 1968
mit Peter Seitz, Realschullehrer

Schulbildung: 1951 - 1955 Volksschule in Fürstenfeldbruck
1955 - 1964 Oberrealschule in Fürstenfeldbruck, Abitur

Berufsausbildung:

Apotheker-Praktikum 1964 - 1965 Winthir-Apotheke am Rotkreuzplatz, München
1965 - 1966 Stadt-Apotheke, Fürstenfeldbruck

Pharm.Vorexamen 27.9.1966

Studium der Pharmazie WS 1966/67 - WS 1969/70 an der Ludwig-Maximilians-Universität München

Pharm.Staatsexamen 14.4.1970

Approbation 1.6.1971

Berufliche Tätigkeit 1970 - 1974

Wissenschaftliche Tätigkeit 1.1.1975 Beginn der vorliegenden Arbeit unter Leitung von Professor Dr.H.Wagner am Institut für Pharmazeutische Arzneimittellehre der Universität München, mit gleichzeitiger Tätigkeit als wissenschaftliche Hilfskraft

Juni bis November 1977 Fortführung der Arbeit an der Florida State University, Tallahassee, Florida, USA, unter Leitung von Professor Dr.W.Herz

WS 1978/79 Abschluß der Promotionsarbeit in München